

Aus der Klinik für Neurologie des Fachbereichs Medizin
der Philipps-Universität Marburg
Geschäftsführender Direktor: Prof. Dr. med. Dr. h.c. W. H. Oertel
in Zusammenarbeit mit dem Universitätsklinikum Gießen und Marburg GmbH
Standort Marburg

**Evaluierung des natürlich vorkommenden
Autoantikörpers gegen α -Synuclein als potentieller
Biomarker für das idiopathische Parkinsonsyndrom**

Inaugural-Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades
der gesamten Humanmedizin



dem Fachbereich Medizin der Philipps-Universität vorgelegt von

Elias Wolf

aus Regensburg

Marburg an der Lahn 2012

Angenommen vom Fachbereich Medizin der Philipps-Universität Marburg am:
23.11.2012

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs.

Dekan: Prof. Dr. med. Matthias Rothmund

Referent: Prof. Dr. med. Richard Dodel

1. Korreferent: Prof. Dr. rer. physiol. Markus Schnare

INHALTSVERZEICHNIS

1	ZUSAMMENFASSUNG	1
2	SUMMARY	3
3	EINLEITUNG	5
3.1	Das idiopathische Parkinsonsyndrom	5
3.1.1	Einführung	5
3.1.2	Epidemiologie	6
3.1.3	Einteilung und klinisches Erscheinungsbild	6
3.1.4	Pathophysiologie und Pathogenese	9
3.1.5	Diagnostik	14
3.1.6	Therapie	16
3.2	α -Synuclein	18
3.2.1	Die Synucleinfamilie	18
3.2.2	Expression und Proteinstruktur	18
3.2.3	Physiologische Funktion	19
3.2.4	Pathophysiologische Aspekte	20
3.3	Natürlich vorkommende Autoantikörper gegen α -Synuclein	24
3.3.1	Einführung: natürlich vorkommende Autoantikörper	24
3.3.2	Physiologische Bedeutung von natürlichen Autoantikörpern	26
3.3.3	Natürliche Autoantikörper bei neurodegenerativen Erkrankungen: Beispiel Alzheimer Demenz	27
3.3.4	Beschreibung des α -Synuclein Autoantikörpers	29
3.4	Biomarkerforschung beim idiopathischen Parkinsonsyndrom	30
3.4.1	Definition: Biomarker	30
3.4.2	Notwendigkeit von Biomarkern beim IPS	31
3.4.3	Stand der Forschung zu fluiden Biomarkern beim IPS	33
3.5	Ziel der Arbeit	36
4	MATERIAL	38
4.1	Geräte	38
4.2	Verbrauchsmaterialien	39
4.3	Chemikalien	40
4.4	Lösungen und Puffer	42
5	METHODEN	46
5.1	Affinitätschromatographie	46
5.1.1	Theoretischer Hintergrund	46
5.1.2	Aufbau	47

5.1.3	Arbeitsablauf: Aufreinigung und Elution	48
5.1.4	Aufkonzentrierung des eluierten Autoantikörpers	49
5.2	Western-Blot	50
5.2.1	Theoretischer Hintergrund	50
5.2.2	Protein Vorbereitung	51
5.2.3	Durchführung der Gelelektrophorese	51
5.2.4	Blotten und Proteindetektion	51
5.3	ELISA	52
5.3.1	Theoretischer Hintergrund	52
5.3.2	Protokoll: α -Synuclein Autoantikörper Serum ELISA	56
5.3.3	Protokoll: α -Synuclein Serum ELISA	57
5.3.4	Validierung der etablierten ELISAs	58
5.4	Untersuchungsmaterial: Serum von Patienten und gesunden Kontrollpersonen	59
5.4.1	Probandenrekrutierung und Datenerhebung	59
5.4.2	Serumgewinnung und Lagerung	61
5.5	Statistische Auswertung	61
5.5.1	Auswertung der Messdaten	61
5.5.2	Auswertung der diagnostischen Testgüte	61
6	ERGEBNISSE	64
6.1	Bindungsspezifität des affinitätsgereinigten IVIg Autoantikörpers im Western-Blot	64
6.2	Etablierung des α -Synuclein Autoantikörper Serum ELISAs – Schritt I: Aufbau	65
6.2.1	Grundannahmen zur Etablierung	65
6.2.2	Quantifizierung unspezifischer Hintergrundaktivität des Serums	67
6.2.3	Vergleich verschiedener Blockierungs- und Verdünnungslösungen	69
6.2.4	Vergleich unterschiedlicher ELISA Platten	72
6.2.5	Vergleich unterschiedlicher α -Synucleinbeschichtungen	73
6.2.6	Vergleich verschiedener Sekundärantikörperverdünnungen	74
6.2.7	Konsequenzen aus den Ergebnissen der Etablierung Schritt I	75
6.3	Etablierung des α -Synuclein Autoantikörper ELISAs für Serum – Schritt II: Validierung ..	77
6.3.1	Bindungsspezifität des IVIg- und Serumautoantikörpers im ELISA	77
6.3.2	Linearitätsprüfung des Standards und Bestimmung der unteren Nachweisgrenze	79
6.3.3	Messgenauigkeit: Spike-Recovery-Test und Verdünnungslinearität	80
6.3.4	Intra- und Inter-Assay Präzision	84
6.4	Etablierung des α -Synuclein ELISAs für Serum – Schritt I: Aufbau	86
6.5	Etablierung des α -Synuclein ELISAs für Serum – Schritt II: Validierung	88
6.5.1	Linearitätsprüfung des Standards und Bestimmung der unteren Nachweisgrenze	88
6.5.2	Messgenauigkeit: Spike-Recovery-Test und Verdünnungslinearität	89
6.5.3	Intra- und Inter-Assay Variation	91
6.6	Etablierung des α -Synuclein Autoantikörper ELISAs für Liquor	92

6.7	Messergebnisse im Serum	94
6.7.1	<i>Klinische und demographische Daten der untersuchten Probanden</i>	94
6.7.2	<i>Messung der α-Synuclein Autoantikörperkonzentration im Serum</i>	95
6.7.3	<i>Korrelation: klinische und demographische Parameter und Autoantikörper gegen α-Synuclein</i>	96
6.7.4	<i>ROC Analyse: Sensitivität und Spezifität des Autoantikörper Serum ELISAs</i>	98
6.7.5	<i>Messung der α-Synucleinkonzentration im Serum</i>	101
6.7.6	<i>Korrelation: freies α-Synuclein und Autoantikörper gegen α-Synuclein im Serum</i>	102
7	DISKUSSION	104
7.1	Diskussion präanalytischer Aspekte	104
7.1.1	<i>Patientenrekrutierung und klinische Datenerhebung</i>	104
7.1.2	<i>Umgang mit den verwendeten Serumproben</i>	105
7.2	Diskussion methodologischer Aspekte	107
7.2.1	<i>Umgang mit der unspezifischen Hintergrundaktivität des Serums</i>	107
7.2.2	<i>Beurteilung der Autoantikörpermessung im Liquor</i>	111
7.2.3	<i>Bewertung der Validität der etablierten Assays für Serum</i>	111
7.3	Diskussion der Messergebnisse im Serum	115
7.3.1	<i>Konzentration des natürlichen Autoantikörpers gegen α-Synuclein</i>	115
7.3.2	<i>Konzentration des α-Synucleins</i>	119
7.3.3	<i>Natürliche Autoantikörper gegen α-Synuclein als diagnostischer Biomarker</i>	121
7.4	Schlussfolgerung	124

ANHANG

MESSDATEN	I
LITERATURVERZEICHNIS	V
ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	XXVI
ABBILDUNGS- UND TABELLENVERZEICHNIS	XXVIII
KLINISCHE BEURTEILUNGSSKALEN	XXX
DANKSAGUNG	XXXIV
LISTE DER AKADEMISCHEN LEHRER	XXXV

1 ZUSAMMENFASSUNG

Das idiopathische Parkinsonsyndrom (IPS) gehört mit einer Prävalenz von 100-200/100.000 zu den häufigsten neurodegenerativen Erkrankungen. Das typische klinische Erscheinungsbild setzt sich aus Tremor, Rigor, Bradykinese und einer posturalen Haltungsinstabilität zusammen. Das histopathologische Korrelat der klinischen Symptome zeigt sich in der neuronalen Degeneration vor allem dopaminerger Neurone der *Substantia nigra pars compacta* des Mittelhirns. Zudem finden sich charakteristische zytoplasmatische Amyloideinschlüsse, sogenannte Lewy-Körperchen, in den überlebenden Zellen. Die Lewy-Körperchen bestehen hauptsächlich aus fibrilliertem α -Synuclein, einem neuronalen Protein der Präsynapse. Der Amyloidbildenden Eigenschaft des α -Synucleins wird heute eine zentrale Rolle in der Pathogenese des IPS und anderen Synucleinopathien zugesprochen. Es gibt zunehmend Hinweise, dass α -Synuclein Oligomere, Vorstufen der reifen α -Synuclein Fibrillen, das eigentliche zelltoxische Potential tragen. Kürzlich wurden im Serum von IPS-Patienten und gesunden Kontrollprobanden polyklonale Autoantikörper gegen α -Synuclein nachgewiesen. Sie könnten eine Rolle in der physiologischen Metabolisierung des Proteins spielen und besitzen *in vitro* einen neuroprotektiven Effekt. Die klinische Diagnostik des IPS wird durch das heterogene Erscheinungsbild und durch die überlappende Symptomatik mit anderen neurologischen Erkrankungen erschwert. Verlässliche diagnostische Biomarker stehen trotz umfangreicher Forschung für den praktisch-klinischen Einsatz bislang nicht zur Verfügung. Insbesondere vor dem Hintergrund aufkommender neuroprotektiver Medikamente sind Biomarker, die nachweislich mit dem Ausmaß der zellulären Degeneration korrelieren, dringend nötig. Die vorliegende Arbeit befasste sich mit dem Potential der natürlichen Autoantikörper gegen α -Synuclein als diagnostischer Biomarker für das IPS.

Hierzu wurde ein indirekter ELISA etabliert und nach gängigen laborchemischen Kriterien validiert, um die Verteilung des Autoantikörpers im humanen Serum quantitativ zu erfassen. Mittels Affinitätschromatographie wurde aus einem kommerziell erhältlichen Antikörperkonzentrat (IVIg) der natürliche Autoantikörper gegen α -Synuclein extrahiert. Im Western-Blot erfolgte die Prüfung der Bindungsspezifität, bevor er als Standard- und Referenzprobe im ELISA verwendet wurde. Diverse Blockierungsreagenzien wurden bezüglich ihrer Reduktion unspezifischer Hintergrundaktivität von humanem Serum im indirekten ELISA getestet. Der etablierte ELISA zeigte eine spezifische Abnahme in der Verdünnungslinearität mit einer

Fehlerrate von unter 20%, eine 91%ige mittlere *Spike Recovery* und eine Intra- und Inter-Assay Variation von 3,7 bzw. 8,8%.

Patienten mit IPS (n=63), Alzheimer Demenz (AD) (n=43) und gesunden Kontrollprobanden (n=46) wurden für die Studie rekrutiert. Neben dem Alter der Probanden, wurde bei IPS Patienten zusätzlich die Krankheitsdauer und –schwere, nach Hoehn und Yahr und dem motorischen Anteil der UPDRS, erhoben. In allen Fällen wurde die Konzentration des natürlichen Autoantikörpers im Serum bestimmt. In einigen Fällen folgte zusätzlich die Bestimmung des freien α -Synucleins im Serum nach einem bereits publizierten ELISA Protokoll. Es zeigte sich ein signifikanter Unterschied in der Konzentration des Autoantikörpers zwischen den gesunden Kontrollen, Patienten mit IPS und AD ($p=0,005$; Kruskal-Wallis-Test). In der *post-hoc* paarweisen Analyse der Gruppen mittels der Dunn's Test ergab sich ein signifikanter Unterschied zwischen gesunden Kontrollen vs. IPS-Patienten ($p<0,05$), AD- vs. IPS-Patienten ($p<0,05$) und kein Unterschied zwischen gesunden Kontrollen vs. AD-Patienten. Eine Korrelation zwischen Alter, der Dauer oder Schwere des IPS, der α -Synucleinmenge und der Konzentration des natürlich vorkommenden Autoantikörpers konnte nicht nachgewiesen werden. Mittels *Receiver Operating Characteristic* (ROC) Analyse wurde die diagnostische Sensitivität und Spezifität des Assays evaluiert. Die Fläche unterhalb der ROC Kurve (AUC: *area under curve*) ergab einen Wert von 0,662 (95% Konfidenzintervall: 0,561-0,763; $p<0,05$) für IPS-Patienten vs. gesunde Kontrollen und einen Wert von 0,650 (95% Konfidenzintervall: 0,545-0,754; $p<0,05$) für IPS vs. AD-Patienten. Nach Bestimmung des Youden-Index zeigte sich für IPS-Patienten vs. gesunden Kontrollen bzw. IPS- vs. AD-Patienten eine Sensitivität und Spezifität von 32% und 98% bzw. von 30% und 95%. Unter Festlegung einer klinisch relevanten Sensitivität von mindestens 85% wurde eine Spezifität für beide Vergleichsgruppen von 25% erreicht. Hinsichtlich des freien α -Synucleingehalts im Serum unterschieden sich die Gruppen nicht.

In der Arbeit konnte zum ersten Mal nachgewiesen werden, dass der natürliche Autoantikörper gegen α -Synuclein im Serum bei IPS-Patienten in wesentlich geringerer Konzentration vorliegt als bei gesunden Kontrollen und AD-Patienten. Der etablierte Assay erreicht als diagnostischer Test eine mäßig ausgeprägte Genauigkeit in der Differenzierung der diagnostischen Gruppen. Weitere differenzierte Untersuchungen sind daher nötig, um die Wertigkeit der natürlichen Autoantikörper gegen α -Synuclein als potentieller Biomarker für das IPS abschließend zu prüfen.

2 SUMMARY

Parkinson's disease (PD) has a prevalence of 100-200/100000 and is one of the most common neurodegenerative diseases. It typically manifests with resting tremor, bradykinesia, rigidity and postural instability. The clinical symptoms correlate to specific histopathological alterations like the neuronal degeneration of dopaminergic neurons of *Substantia nigra pars compacta* and the appearance of intracytoplasmatic amyloidal inclusions, called Lewy bodies, in surviving cells. Lewy bodies primarily consist of fibrillated α -Synuclein, a neuronal presynaptic protein. The amyloid building property of α -Synuclein is thought to play an important role in the pathogenesis of PD and other synucleinopathies. There is mounting evidence that α -Synuclein oligomers, intermediate products of the mature fibrils of α -Synuclein, carry the actual cell toxic potential. Recently, the existence of naturally occurring polyclonal autoantibodies against α -Synuclein in serum of PD patients and healthy controls has been shown. They seem to take part in the metabolism of α -Synuclein and display a neuroprotective effect *in vitro*. The clinical diagnosis of PD is challenged by the overlap of symptoms with other neurological diseases. Despite considerable scientific research, reliable biomarkers for the diagnosis of PD in common clinical practice are still missing. With upcoming neuroprotective therapies biomarkers are urgently needed, which correlate to the extent of neuronal degeneration.

This study evaluated the natural occurring autoantibodies against α -Synuclein as potential biomarkers in PD. Therefore, an indirect ELISA was established and validated according to common clinical and laboratory standards in order to quantify the amount of the autoantibody in the human serum. Using affinity chromatography natural occurring autoantibodies were isolated from human intravenous immunoglobulin (IVIg) solutions. Binding specificity of purified IVIg autoantibodies was tested using Western-Blot, before they were applied in ELISA as standard and reference samples. Various blocking agents were tested for reducing unspecific binding of serum in the indirect ELISA. The established ELISA showed a specific decline in linearity-of-dilution experiments with an error rate less than 20%, an average spike-recovery of 91% and an intra- and inter-assay coefficient of variation of 3,7 and 8,8%, respectively.

Patients with PD (n=63), with Alzheimer's disease (AD) (n=43) and healthy controls (n=46) were recruited. Beside the age at study, duration and severity of disease (Hoehn and Yahr; UPDRS) was additionally assessed in PD patients. In all cases levels of natural autoantibodies were measured. In several cases a previously published ELISA

was used to additionally measure the amount of free α -Synuclein in serum. A statistical significant difference of the amount of autoantibodies was shown between healthy controls, patients with PD and patients with AD ($p=0.005$; Kruskal-Wallis test). Post-hoc multiple comparison of the groups with Dunn's method revealed a significant difference between healthy controls vs. PD patients ($p<0.05$), AD vs. PD patients ($p<0.05$) and no difference between healthy controls vs. AD patients. No correlation was found between age at study, duration or severity of disease and the amount of free α -Synuclein with naturally occurring autoantibodies. Receiver Operating Characteristic (ROC) analysis was used to evaluate the diagnostic sensitivity and specificity of the assay. The area under the ROC curve (AUC: area under curve) was 0.662 (95% confidence interval: 0.561-0.763; $p<0.05$) for PD patients vs. healthy controls 0.650 (95% confidence interval: 0.545-0.754; $p<0.05$) for PD vs. AD patients. The Youden index revealed for PD patients vs. healthy controls a sensitivity and specificity of 32% and 98% and for PD vs. AD patients a sensitivity and specificity of 30% and 95%. With a fixed sensitivity of 85% a specificity of 25% for both comparisons was reached. The amount of free α -Synuclein did not differ between groups.

This study showed for the first time significantly reduced levels of the naturally occurring autoantibody against α -Synuclein in the serum of PD patients compared to healthy controls and patients with AD. The established assay showed a moderate accuracy as a diagnostic tool in properly differentiating diagnostic groups. Further studies are necessary to assess the value of naturally occurring autoantibodies against α -Synuclein as a reliable biomarker for PD.

3 EINLEITUNG

3.1 Das idiopathische Parkinsonsyndrom

3.1.1 Einführung

Das idiopathische Parkinsonsyndrom (IPS), synonym auch Morbus Parkinson oder primäres Parkinsonsyndrom genannt, stellt eines der klassischen Krankheitsbilder der Neurologie dar. Es wird traditionsgemäß auf Grund der neurodegenerativen Störung der Basalganglienschleife und der Substantia nigra im Mittelhirn zu den extrapyramidalen Bewegungsstörungen gezählt. Eine erstmalige detailliert analytische Syndrombeschreibung formulierte 1817 der englische Arzt James Parkinson in seiner Abhandlung mit dem Titel *An Essay on the Shaking Palsy* (Parkinson 2002). An Hand von sechs Fallbeispielen, die Parkinson selbst beobachtet hatte, fasste er einzelne Krankheitssymptome erstmalig zu einem Syndromkomplex namens *paralysis agitans* (lat. Schüttellähmung) zusammen. Zu den wesentlichen Symptomen zählte Parkinson einen unwillkürlichen Ruhetremor, eine Störung der aufrechten Körperhaltung, eine Gangstörung und die auffälligerweise fehlende kognitive Beeinträchtigung der betroffenen Patienten. Der berühmte französische Neurologe Jean-Martin Charcot betonte 70 Jahre später, dass der Ruhetremor nicht zwangsläufig bei der Erkrankung auftreten müsse, und benannte sie von *paralysis agitans* in Parkinson'sche Krankheit um (Goetz 1986). Im heutigen klinischen Sprachgebrauch spricht man im Allgemeinen vom Parkinsonsyndrom oder Parkinsonismus und subsumiert darunter folgende Kardinalsymptome (Ceballos-Baumann 2006):

- Bradykinese (Akinese, Hypokinese)
- Rigor
- Ruhetremor
- posturale Instabilität (Störung der reflektorischen Ausgleichsbewegung bei passiver Auslenkung aus dem Gleichgewicht)

Ein Parkinsonismus findet sich neben dem IPS auch bei einer Reihe anderer Erkrankungen unterschiedlicher Ätiologie. Das IPS selbst stellt eine eigenständige Krankheitsentität dar, die durch ein Parkinsonsyndrom und weitere spezifische klinische Kriterien definiert wird. Eine ausführliche Beschreibung folgt in den anschließenden Kapiteln.

3.1.2 Epidemiologie

Das IPS ist neben dem essentiellen Tremor die häufigste Bewegungsstörung und nach dem Morbus Alzheimer die zweithäufigste neurodegenerative Erkrankung (Tanner and Aston 2000). Sie tritt typischerweise zwischen dem 50. und 70. Lebensjahr auf. Die Prävalenz über die gesamte Altersspanne variiert zwischen 100 bis 200 pro 100.000 Einwohner und nimmt mit dem Alter rapide zu (von Campenhausen et al. 2005). Bei ca. 3% der Fälle erfolgt die Diagnose vor dem 50. Lebensjahr. Die Anzahl der Neuerkrankungen (Inzidenz) über die gesamte Altersspanne wird auf 10-20 pro 100.000 Einwohner und Jahr geschätzt. Dabei steigt auch die Inzidenz mit zunehmendem Alter an. So findet sich in der Alterskohorte der 50-59-jährigen eine Rate von 10/100.000 p.a. und bei den 70-79-jährigen eine Rate von 107/100.000 p.a. (Van Den Eeden et al. 2003). Es gibt Hinweise für einen geschlechtsspezifischen Unterschied in der Inzidenz mit einer 1,5 bis 2fach höheren Rate für Männer (Granieri et al. 1991; Van Den Eeden et al. 2003). Das IPS tritt meist sporadisch auf und ist durch einen langsamen chronisch progredienten Verlauf gekennzeichnet. Die mittlere Erkrankungsdauer von Diagnosestellung bis zum Tod beträgt 15 bis 20 Jahre (Elbaz et al. 2003; Fahn 2003).

3.1.3 Einteilung und klinisches Erscheinungsbild

Wie schon zuvor angedeutet, findet sich ein Parkinsonsyndrom bzw. ein Parkinsonismus neben dem IPS im engeren Sinne auch bei anderen Erkrankungen unterschiedlicher Ätiologie. In der heutigen Einteilung der Parkinsonsyndrome werden vier klinische Gruppen unterschieden (Bach et al. 2010):

1. Familiäre Formen: Hierunter werden Parkinsonsyndrome subsumiert, denen eine nachgewiesene monogenetische Ursache zugrunde liegt. Sie sind für weniger als 10% der Parkinsonsyndrome verantwortlich (Bronstein et al. 2009) und zeichnen sich meist durch einen frühen Krankheitsbeginn aus (siehe hierzu die Kapitel *Pathophysiologie und Pathogenese* des IPS und *pathophysiologische Aspekte des α -Synucleins*).
2. Primäres bzw. idiopathisches Parkinsonsyndrom (IPS): häufigste und mitunter sehr heterogene Form, die sporadisch auftritt und deren Ätiologie bislang nicht geklärt ist.

3. Sekundäres oder symptomatisches Parkinsonsyndrom: meist durch Medikamente induziert (v.a. Antipsychotika), durch Intoxikation (Pestizide) oder auf dem Boden einer vaskulären Enzephalopathie.
4. Atypische Parkinsonsyndrome oder Parkinson-Plus-Syndrome: Hierunter werden andere neurodegenerative Erkrankungen verstanden, die mit einem Parkinsonsyndrom einhergehen können. Dazu zählen die sogenannten Synucleinopathien, wie die Multisystematrophie und die Demenz vom Lewy-Körper-Typ, oder Tauopathien, wie die progressive supranukleäre Blickparese und die kortikobasale Degeneration.

In letzter Zeit sind erhebliche Zweifel an der Differenzierung der Demenz vom Lewy-Körper-Typ und des IPS mit oder ohne Demenz im späteren Krankheitsverlauf aufgetreten. Auf Grund überschneidender hirnpathologischer Veränderungen favorisieren einige Autoren den Begriff der Lewy-Körperchen-Erkrankung, in deren Spektrum sich entweder eine Demenz vom Lewy-Körper-Typ oder das IPS mit oder ohne Demenz entwickelt (Aarsland et al. 2004; Richard et al. 2002).

Auch im Rahmen anderer Erkrankungen, die nicht klassischerweise zu den Parkinsonsyndromen gezählt werden, können parkinsonähnliche Symptome auftreten. Hierzu zählen die Alzheimer Demenz, die Chorea Huntington, der Morbus Wilson, die spinocerebelläre Ataxien, die frontotemporalen Demenzen und die L-Dopa-sensitive Dystonie (Bach et al. 2010).

Die Kardinalsymptome des Parkinsonsyndroms, wie sie typischerweise beim IPS zu finden sind, werden im Folgenden beschrieben (Ceballos-Baumann 2006; Bach et al. 2010; Fahn 2003):

Die Störung der Willkürbewegung manifestiert sich als Verlangsamung (Bradykinese), Verminderung (Hypokinese) oder Verlust (Akinese) des spontanen Bewegungsablaufs und bildet das Leitsymptom der klinischen Diagnostik. Die **Bradykinese** deutet sich schon in der frühen Krankheitsphase bei schnellen repetitiven Agonisten-Antagonisten-Bewegungen (Diadochokinese) der betroffenen Extremität im Seitenvergleich an. Die Patienten zeigen in der klinischen Untersuchung beispielsweise eine Verlangsamung der schnellen Supination-Pronationsbewegung der Hände. Allgemein manifestiert sich die Bewegungsstörung in einer verminderten Feinmotorik, wie z.B. ein Geschicklichkeitsverlust der Hände beim Knöpfen des Hemdes oder Schwierigkeiten beim

Schreiben. Die Handschrift wird im Verlauf zunehmend kleiner und undeutlicher (Mikrographie). Die Betroffenen fallen auch durch eine reduzierte Gesichtsmimik (Hypomimie) oder einem kleinschrittigen und häufig einseitig schlürfendem Gangbild mit fehlendem Mitschwingen der Arme auf. Sie wirken in ihrem Handeln verzögert und schwerfällig. Die Stimme wird leiser und monoton (Hypophonie) und bekommt einen heiseren Charakter. Mit dem Fortschreiten der Erkrankung treten akinetische Aspekte, wie Startschwierigkeiten beim Aufstehen aus dem Sitzen, Blockaden während des Gehens (z.B. beim Übertreten einer Türschwelle) und beim Drehen der Körperachse im Liegen, in den Vordergrund. In ausgeprägten Krankheitsfällen kommt es im Verlauf zu Schluckstörungen, die mitunter eine enterale Sondenernährung notwendig machen.

Als **Rigor** versteht man eine gleichbleibende wächserne Tonuserhöhung der Skelettmuskulatur bei passiver Bewegung. Durch aktive Bewegung der gegenseitigen Extremität (z.B. Zeichnen einer imaginären Acht mit dem anderen Arm) lässt sich der Rigor der betroffenen Extremität in der klinischen Untersuchung verstärken. Dabei tritt der Rigor zu Beginn meist in den proximalen Muskelgruppen der oberen Extremität auf. Die dabei entstehenden subjektiv empfundenen ziehenden Schulter-Arm-Schmerzen der Patienten werden nicht selten als rheumatische oder degenerative Gelenksbeschwerden fehldiagnostiziert.

Ein zunächst unilateraler **Tremor** findet sich bei etwa 50% der Patienten als initiales Symptom. Dabei handelt es sich um einen Ruhetremor – Agonisten-Antagonistentremor mit einer Frequenz von 4-6 Hz – zu dem in allen Stadien der Erkrankung ein höherfrequenter Haltetremor hinzutreten kann. Bei mentaler Belastung (z.B. Rechenaufgabe in der klinischen Untersuchung) oder emotionalem Stress kann ein latent vorhandener Tremor sichtbar oder ein bestehender Ruhetremor in seiner Amplitude verstärkt werden. Typischerweise sistiert der Ruhetremor beim Ausführungsbeginn von Willkürbewegungen. Treten Rigor und Tremor gleichzeitig auf, findet man bei passiver Bewegung der Extremität eine rhythmische Unterbrechung des Bewegungsflusses (Zahnradphänomen).

Unter **posturaler Instabilität** versteht man eine Störung der reflektorischen Ausgleichsbewegung nach passiver Auslenkung aus dem Gleichgewicht. Ein gestörter Stellreflex lässt sich in der klinischen Untersuchung durch den *Zieh-Test* nachweisen. Dabei zieht der hinter dem Patienten stehende Untersucher diesen an beiden Schultern unvermittelt nach hinten. Ein pathologischer *Zieh-Test* zeigt sich bei einer

gesteigerten Auslenkbarkeit nach hinten mit mehreren Stabilisierungsschritten (Retropulsion) oder einem drohendem Rückwärtsfallen des Patienten. Die gebeugte Haltung der Patienten nach vorn (Propulsion) führt nicht selten zu einer ungewollten Schrittbeschleunigung beim Gehen (Festination), was eine hohe Sturzgefährdung birgt.

Von entscheidender, diagnostischer Bedeutung ist die Feststellung, dass beim IPS die motorischen Kardinalsymptome stets einseitig auftreten und im Verlauf der Krankheit asymmetrisch ausgeprägt bleiben. Je nach führendem klinischen Symptom werden an Hand der Kardinalsymptome ein Tremordominanztyp, ein hypokinetisch-rigider Typ und ein Äquivalenztyp (gleichrangiges Auftreten von Tremor und Rigidität) unterschieden.

Neben den oben erwähnten Symptomen treten beim IPS auch **nicht-motorische Störungen** auf. Hierzu zählen Störungen des autonomen Nervensystems wie orthostatische Dysregulation, Hyper- oder Hypohydrose, Potenzstörungen, verzögerte Magenentleerung, Obstipation und Harninkontinenz. Aber auch neuropsychiatrische Symptome, wie affektive und Angststörungen, Halluzinationen, kognitive Beeinträchtigungen im Sinne einer frontalen exekutiven Dysfunktion bis hin zur manifesten Demenz und komplexen Verhaltensstörung, können im Verlauf auftreten (Bassetti 2010; Lohle et al. 2009). In letzter Zeit konnte gezeigt werden, dass einige nicht-motorischen Störungen, insbesondere REM-Schlafverhaltensstörungen (engl. REM: *Rapid Eye Movement*), Riechstörungen und ein depressives Syndrom den klassischen motorischen Symptomen Jahre bis Jahrzehnte vorausgehen können (Hawkes 2008; Poewe 2008). Die nicht motorischen Störungen haben dabei einen erheblichen Einfluss auf die vom Patienten erlebte Lebensqualität (Chaudhuri et al. 2011). Dies hat nicht zuletzt zu einem veränderten Verständnis der Erkrankung geführt. Die Vorstellung verschiebt sich von einer rein motorischen Störung zu einer multisystemischen Komplexerkrankung (Langston 2006).

3.1.4 Pathophysiologie und Pathogenese

Aus heutiger Sicht besteht die neurobiologische Ursache der extrapyramidal-motorischen Störungen des IPS und einiger anderer Parkinsonsyndrome in der nigrostrialen dopaminergen Degeneration (Hornykiewicz 2008). Das morphologische Korrelat dieser Degeneration ist der Verlust dopaminerger Zellen der Substantia nigra *pars compacta* (SNpc) des Mittelhirns und das Auftreten intrazytoplasmaler

proteinreicher Einschlüsse, sogenannter Lewy-Körperchen (Dickson et al. 2009). Eine detaillierte Beschreibung dieser Proteinkörperchen beim Parkinsonsyndrom erfolgte schon 1912 durch den deutschen Neuropathologen Friedrich Lewy (Rodrigues e Silva et al. 2010). Dabei handelt es sich um runde eosinophile Proteinaggregate im neuronalen Perikaryon, die sich neben Ubiquitin und Neurofilamenten hauptsächlich aus fibrillierten α -Synuclein Protein zusammensetzen (Spillantini et al. 1997). Zusätzlich finden sich in den Nervenzellfortsätzen (Neuriten) ebenfalls immunhistochemisch α -Synuclein positive Ablagerungen (Lewy Neuriten) (Braak et al. 1999). Dopaminerge Zellen der SNpc projizieren in das Striatum, das aus *Putamen* und *Nucleus caudatus* besteht. Die Degeneration der nigrostriatalen Projektion hat erheblichen Einfluss auf die Initiation und Ausführung motorischer Bewegungen. Dopamin reduziert über die Bindung an D1- oder D2-Rezeptoren im Striatum direkt und indirekt über die Inhibition des *Nucleus subthalamicus* die tonisch hemmende Aktivität des *Globus pallidus internus* auf den *ventro-anterio*ren und *ventro-lateralen Thalamus* (Abb. 1). Durch eine verminderte Dopaminwirkung hemmen der *Globus pallidus internus* und indirekt der *Nucleus subthalamicus* kontinuierlich die thalamokortikale Projektion und unterdrücken damit die Willkürbewegung (Purves 2004). In der Tat korreliert das Ausmaß der Bradykinese und des Rigors bei Parkinson-Patienten mit dem nigralen Zellverlust und dem reduzierten striatalen Dopaminspiegel, aber nicht mit dem Ausmaß der Lewy-Körperchen-Pathologie in der SNpc (Greffard et al. 2008; Ma et al. 1997). Beim ersten Auftreten motorischer Parkinsonsymptome sind bereits 60% der Dopamin produzierenden Zellen der SNpc untergegangen und die striatale Dopaminkonzentration um 80% gesunken (Bernheimer et al. 1973; Fearnley and Lees 1991). Folglich sprechen motorische Defizite beim IPS sehr gut auf eine therapeutische Substitution des fehlenden Dopamins an (Fahn 2003).

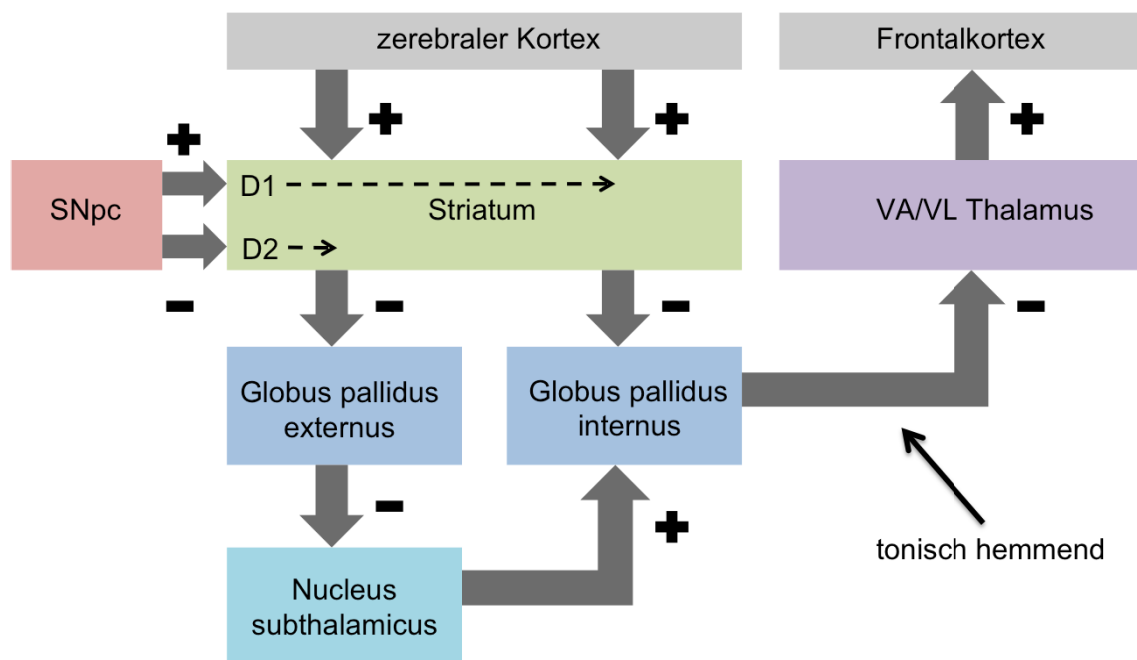


Abb. 1: Schematische Darstellung der motorischen Komponenten der Basalganglien. Dopamin aus der SNpc übt direkt über D1 Rezeptoren und indirekt über D2 Rezeptoren einen hemmenden Einfluss auf die tonisch-hemmende Aktivität des *Globus pallidus internus* auf den *ventro-anterioren* (VA) und *ventro-lateralen* (VL) Thalamus aus. Bei Dopaminmangel im Rahmen der neuronalen Degeneration beim IPS wird das *Striatum* in seiner hemmenden Wirkung auf den *Globus pallidus internus* nicht ausreichend aktiviert (direkter Einfluss über D1 Rezeptoren). Gleichzeitig führt die fehlende Hemmung andere Zellen des *Striatums* zu einer Hemmung des *Globus pallidus externus*, was wiederum die fehlende Hemmung des *Nucleus subthalamicus* nach sich zieht (indirekter Einfluss über D2 Rezeptoren). Der *Nucleus subthalamicus* kann nun seinerseits den *Globus pallidus internus* zusätzlich aktivieren. Sowohl die fehlende direkte, wie indirekte Wirkung des Dopamins führen zu einer verstärkten Hemmung des VA/VL Thalamus und damit zu einer Störung der Initiation von Willkürbewegungen. Abbildung modifiziert nach Purves (2004).

Parallel zu dem gesteigerten klinischen Interesse an den nicht-motorischen Symptomen beim IPS wuchs die Erkenntnis, dass die Lewy-Körperchen-Pathologie wesentlich über die SNpc hinausgeht. So findet sich in Autopsiebefunden die Lewy-Körperchen-Pathologie im peripheren, enterischen und autonomen Nervensystem, im unteren Hirnstamm (dorsale motorische Vaguskerne), im Bulbus olfactorius, im Hippocampus, in der Amygdala und im Neokortex. Die dabei betroffenen neuronalen Zellpopulationen umfassen neben den dopaminergen Zellen, auch noradrenerge Neurone des Locus coeruleus, serotonerge Projektionen der Raphekerne und acetylcholinerge Zellen des basalen Vorderhirns im Nucleus Meynert (Braak and Del Tredici 2008; Shulman et al. 2011). Braak und Kollegen postulierten auf Grund von *post-mortem* Untersuchungen einen stadienhaften neuropathologischen Verlauf des IPS (Abb. 2). Danach vollziehen sich die hirnpathologischen Veränderungen nach

einem stereotypen von caudal nach rostral aufsteigendem Muster, beginnend im unteren Hirnstamm und dem Bulbus olfactorius (Stadium 1), über die Affektion der SNpc (Stadium 3) bis zum Auftreten neokortikaler Lewy-Körperchen (Stadium 5 und 6) (Braak et al. 2003). Das Braak'sche Stadiensystem erklärt möglicherweise somit auch das Auftreten der REM Schlafverhaltensstörung, der unter anderem eine Störung monoaminerger Zellpopulationen des Hirnstamms zu Grunde liegen muss (entsprechend Braak Stadium 2), vor dem Beginn der motorischen Parkinsonsymptome (Stadium 3 und 4) (Boeve et al. 2007). Auch wenn diese Stadieneinteilung das Verständnis der Pathogenese des IPS vorantrieb, bleibt sie umstritten. So zeigten retrospektive klinisch-pathologische Studien besonders bei Patienten mit frühem Krankheitsbeginn, dass sich in 6 bis 40 % der Fälle keine caudo-rostrale Progression der Pathologie findet. Hier müssen andere, wahrscheinlich genetische Faktoren, Einfluss auf das Muster der neuronalen Degeneration haben (Jellinger 2009).

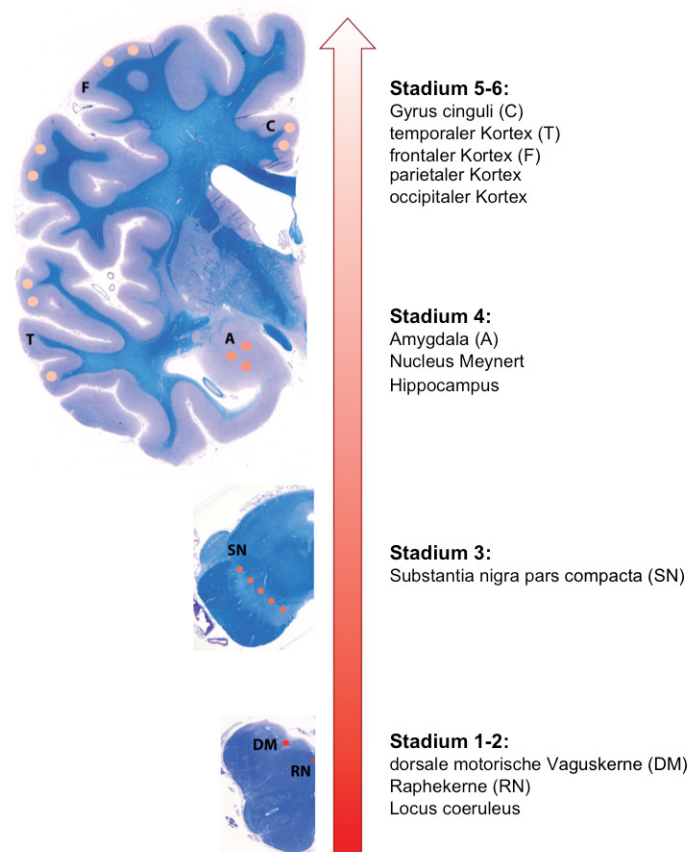


Abb. 2: Stadien der Lewy-Körperchen-Pathologie nach Braak et al. (2003). Abbildung übernommen und modifiziert nach Shulman et al. (2011).

Studien haben in den letzten Jahren eine ganze Reihe neuer Konzepte zur Ätiologie des neuronalen Zellverlustes bei sporadisch auftretendem IPS hervorgebracht. In epidemiologischen Studien wurden verschiedene Umweltfaktoren ausführlich untersucht. Dabei fanden sich allerdings außer dem Faktor „Alter“ und seltenen Intoxikationen durch Umweltgifte kaum andere Umwelteinflüsse mit einer ausreichend hohen Beweiskraft nach Konsensuskriterien (Bronstein et al. 2009), was auf die hohe Bedeutung genetischer Risikofaktoren auch in der sporadischen Form der Erkrankung hinweist (Gasser 2009). Das relative Risiko selbst zu erkranken ist bei erstgradigen Verwandten von IPS Patienten um das zwei bis siebenfache erhöht (Marder et al. 2003; Sveinbjornsdottir et al. 2000).

Aus molekularbiologischen Studien bezüglich der Ursachen des Zelltodes ergeben sich Hinweise auf eine mitochondriale Dysfunktion (Lin and Beal 2006; Schapira et al.

1989), auf gesteigerten oxidativen Stress (Schapira 2008), auf eine Aktivierung der Microglia und einer neuronalen Entzündungsreaktion (Ouchi et al. 2005), auf eine fehlerhafte Proteindegradation und eine konsekutive abnorme Proteinaggregation (Lee et al. 2004). Inwieweit diese einzelnen Befunde sich gegenseitig beeinflussen, zum Auftreten der Lewy-Körperchen-Pathologie und schließlich zum Zelltod führen, bleibt noch zu klären. Wichtige Erkenntnisse zur Pathogenese des IPS ergaben sich auch aus der Untersuchung familiärer monogener Parkinsonsyndrome. Bis heute wurden 16 Genloci (bezeichnet als PARK1 bis 16) und 11 damit assoziierte Gene entdeckt, die durch autosomal dominante oder rezessive Vererbung, seltene parkinsonähnliche Erkrankungsbilder hervorrufen können (Thomas and Beal 2011). Fünf dieser Genmutationen wurden mittlerweile eingehend bezüglich ihrer pathogenetischen Bedeutung untersucht: SNCA (α -Synuclein-Gen) (PARK 1 und 4) führt zur gesteigerten Proteinaggregation, Parkin (PARK2) weist auf eine gestörtes Ubiquitin-Proteasom System hin, PINK1 (PARK6) und DJ-1 (PARK7) sind mit oxidativem Stress und mitochondrialer Dysfunktion verknüpft und LRRK2 (PARK8) zeigt eine dysfunktionale Kinaseaktivität (Schulz 2008; Shulman et al. 2011; Yang et al. 2009). Die dabei gefundenen molekularen Prozesse lassen sich auch auf die häufigere idiopathische Form übertragen (Gasser 2009). Bezüglich der genauen Rolle des α -Synucleins zur Pathogenese bei familiären Parkinsonformen und dem IPS sei auf das eigenständige Kapitel *α -Synuclein* verwiesen.

3.1.5 Diagnostik

Die Diagnostik des IPS basiert heute auf den Kriterien der *UK Brain Bank* und erfolgt in drei Stufen (Gibb and Lees 1988). (1) Als notwendiges Basissymptom gilt die Bradykinese, die durch mindestens ein weiteres Symptom (Rigor, Ruhetremor oder posturale Instabilität) ergänzt werden muss. (2) Zur Abgrenzung des IPS von anderen sekundären, atypischen oder familiären Parkinsonsyndromen müssen eine Reihe von Ausschlusskriterien erfüllt sein. So schließt eine Anamnese mit rezidivierenden zerebralen Ischämien und eine stufenweise Verschlechterung der Symptomatik oder häufige Schädel-Hirn-Traumata in der Vergangenheit die Diagnose IPS aus. (3) Zusätzlich müssen noch drei oder mehr unterstützende Kriterien herangezogen werden, die die definitive Diagnose eines IPS nochmals wahrscheinlicher machen. Hierunter fällt beispielsweise die asymmetrische Ausprägung der Symptome oder das nachweisbare gute Ansprechen auf L-Dopa. Unter Anwendung der *UK Brain Bank*

Kriterien kann nach retrospektiven Autopsiestudien ein IPS durch Fachärzte zu 82% richtig erkannt werden (Hughes et al. 1992). Die Kriterien werden heute weltweit im praktisch klinischen Rahmen oder zu Studienzwecken angewendet (Reichmann 2010).

(1) Diagnose eines Parkinsonsyndroms:

Bradykinese und mindestens eines der folgenden Symptome:

- Rigor
- Ruhetremor (4-6 Hz)
- Posturale Instabilität

(2) Ausschlusskriterien:

- Rezidivierende zerebrale Ischämien mit einer stufenweise Verschlechterung der Parkinsonsymptome
- Rezidivierende Schädel-Hirn-Traumata
- Anamnese einer definitiven Enzephalitis
- Okulogyre Krisen
- Remissionen
- Neuroleptikabehandlung bei Beginn der Symptome
- Mehr als ein Verwandter mit Parkinsonsymptomen
- Ausschließlich einseitige Zeichen nach mehr als 3 Jahren
- Supranukleäre Blickparese
- Zerebelläre Zeichen
- Frühe ausgeprägte autonome Zeichen
- Positives Babinski-Zeichen
- Zerebraler Tumor oder *Hydrozephalus communicans* im CT
- Frühe schwere Demenz mit Störung des Gedächtnisses, der Sprache und Apraxie
- Fehlendes Ansprechen auf L-Dopa
- Toxinexposition (z.B. MPTP)

(3) unterstützende prospektive Kriterien (mindestens 3):

- Einseitiger Beginn
 - Vorhandener Ruhetremor
 - Progressive Erkrankung
 - Persistierende Seitenasymmetrie
 - Gutes Ansprechen auf L-Dopa (70-100%)
 - Schwere L-Dopa-induzierte Chorea
 - Positiver L-Dopa Effekt für mehr als 5 Jahre
 - Erkrankungsdauer länger als 10 Jahre
-

Tab. 1: UK Brain Bank Kriterien nach Gibb und Lees (1988).

Wichtig bleibt herauszustellen, dass die Diagnose der Parkinson-Krankheit rein klinisch gestellt wird und daher der genauen Anamnese und neurologischen Untersuchung des Patienten eine außerordentliche Bedeutung zukommt. Nach den Leitlinien der Expertengruppe des Kompetenznetzes Parkinson (Eggert et al. 2008) dienen apparative oder laborchemische Zusatzuntersuchungen bislang einzig dem Ausschluss von nicht-idiopathischen Parkinsonsyndromen. Mindestens einmal im Rahmen der

Diagnostik sollte ein cCT erfolgen. Bei begründetem Verdacht auf ein atypisches Parkinsonsyndrom kann auch ein cMRT eingesetzt werden. Funktionelle bildgebende Verfahren, wie SPECT oder PET, bleiben speziellen Fragestellungen vorbehalten oder finden im Rahmen der klinischen Forschung Anwendung. Laborchemische Untersuchungen sind bei Patienten mit jungem Krankheitsbeginn zur Bestimmung von Kupfer und Ceruloplasmin im Serum und im 24h Sammelurin zum Ausschluss eines Morbus Wilson angezeigt. In der klinischen Praxis werden zusätzlich pharmakologische *Bedside Tests* (Einmalgabe von L-Dopa oder Apomorphin und anschließende Evaluierung der klinischen Symptombesserung) angewendet (Reichmann 2010). Von manchen Autoren wird die feste Aufnahme von standardisierten Riechtests (z.B. *University of Pennsylvania Smell Identification Test*) wegen der hohen und teilweise schon prämotorisch vorhanden Hyposmierate bei IPS im Rahmen der Diagnosestellung gefordert (Haehner et al. 2007; Lees et al. 2009).

3.1.6 Therapie

Die medikamentöse Therapie des IPS ist bis heute rein symptomatisch und zielt auf die Substitution des zentralen Dopaminmangels ab. L-Dopa, eine Vorstufe des Dopamins, die die Blut-Hirn-Schranke passieren kann, ist das wirksamste Medikament in der Behandlung des IPS (Rascol et al. 2002). Es wird in einer fixen Kombination mit einem peripher wirksamen Decarboxylase-Hemmstoff (*Benserazid* oder *Carbidopa*) verabreicht, um seine frühzeitige Metabolisierung im peripheren Gewebe zu verhindern (Fahn 2003). Die Plasmahalbwertszeit und somit die Wirkdauer kann zusätzlich durch Inhibition der Catechol-O-Methyltransferase (COMT) durch Gabe eines spezifischen COMT-Hemmers (*Entacapon* und *Tolcapon*) verlängert werden (Fahn 2003). Der zentralnervöse Abbau des Dopamins lässt sich durch Gabe eines Monoaminoxidase-B (MAO-B) Hemmers beeinflussen. MAO-B Hemmer (*Selegilin* oder *Rasagilin*) können einzeln oder in Kombination mit L-Dopa verabreicht werden. Während der L-Dopa-Therapie kommt es nach ca. 5 Jahren bei 60% der Patienten zu schwerwiegenden Komplikationen, wie zunehmende Verkürzung der Wirkdauer („*wearing off*“), rapiden Wirkfluktuationen („*on-off*“ und *Freezing*) und Dyskinesien (Eggert et al. 2008). Jüngere Patienten sind von solchen Nebenwirkungen häufig früher betroffen, so dass bei ihnen eine L-DOPA-Therapie, wenn möglich, hinausgezögert werden sollte (Eggert et al. 2008; Fahn 2003). Als eine weitere wichtige Therapieoption gelten die Dopaminagonisten, eine Substanzklasse mit unterschiedlicher Dopaminrezeptorbindung und pharmakokinetischen

Eigenschaften (Rascol et al. 2001). Sie lassen sich in Ergot- und Non-Ergot-Präparate unterteilen. Letztere zeichnen sich durch ein geringeres Nebenwirkungsprofil aus und werden insbesondere bei jungen IPS-Patienten eingesetzt (Eggert et al. 2008). Zu den nicht-dopaminergen Medikamenten zählen die Anticholinergika (z.B. Biperiden) und NMDA-Agonisten (Amantadin und Budipin). Sie gelten nicht als Mittel der ersten Wahl und sind speziellen Behandlungsproblemen, wie Tremor und akinetische Krisen, vorbehalten (Eggert et al. 2008). Bei medikamentös nicht mehr suffizient zu therapierenden Patienten besteht die Möglichkeit der neurochirurgischen Behandlung mittels tiefer Hirnstimulation. Durch stereotaktische Implantation von Elektroden im *Nucleus subthalamicus* oder *Globus pallidus internus* kann unter hochfrequenter Stimulation der Einfluss hemmender Impulse aus den Basalganglien reduziert werden und nachweislich die Motorsymptome verbessert werden (Morley and Hurtig 2010). Diese Therapieoption findet allerdings nur bei einem selektierten Patientengut Anwendung.

Auf die differenzierte medikamentöse und nicht-medikamentöse praktische Behandlung des IPS kann an dieser Stelle nicht weiter eingegangen werden. Ein evidenzbasierter Therapiealgorithmus lässt sich in den Leitlinien der Deutschen Neurologischen Gesellschaft online abrufen (Eggert et al. 2008).

Neuere Therapieansätze konzentrieren sich auf Medikamente, die das Fortschreiten der Erkrankung aufhalten oder zumindest verlangsamen können. Sie fallen unter die Kategorie der neuroprotektiven oder krankheitsmodifizierenden Therapeutika und sind das Ziel der aktuellen Therapieforschung. Eine ganze Reihe an Substanzen, die auf pathogenetische oder protektive Mechanismen abzielen sollen, wurde bislang in klinischen Studien untersucht, ohne dass sich ein positiver Einfluss auf das klinische Outcome zeigen ließ (Morley and Hurtig 2010). Einzig die MAO-B-Hemmer, Selegilin und Rasagilin, und das mitochondrial wirksame Coenzym Q10 zeigten in kontrollierten klinischen Studien eine mögliche neuroprotektive Qualität (Olanow et al. 2009; Shoulson et al. 2002; Shults et al. 2002). Eine Meta-Analyse epidemiologischer Studien gab den Hinweis, dass die Einnahme nichtsteroidaler anti-entzündlicher Substanzen die Parkinsoninzidenz möglicherweise durch die Hemmung neuroinflammatorischer Prozesse um 15% senken kann (Gagne and Power 2010). Prospektive Studien hierzu fehlen allerdings noch.

3.2 α -Synuclein

3.2.1 Die Synucleinfamilie

Maroteaux und seine Mitarbeiter beschrieben 1988 erstmals die Gensequenz eines Proteins in Zellen des elektrischen Organs eines Rochens (*Torpedo californica*), das sich ausschließlich in der Nähe synaptischer Vesikel und in Teilen des Nukleus befand. Sie nannten es konsequenterweise Synuclein (Maroteaux et al. 1988). 1993 entdeckten Ueda und Kollegen in Amyloidplaques im Gehirn von Alzheimerpatienten neben dem A β -Peptid ein bislang unbekanntes ca. 35 Aminosäuren langes Eiweißmolekül (NAC: *non-amyloid- β -component*), das sich aus einem 140 Aminosäuren langem Vorläuferprotein (NACP: *NAC precursor*) bildete (Ueda et al. 1993). Schließlich berichteten Jakes und Kollegen 1994 von zwei zu 61% homologen 140 und 134 Aminosäuren langen Proteinen, die sie zufälligerweise durch Kreuzreaktion eines monoklonalen Antikörpers gegen phosphoryliertes Tau-Protein in Alzheimergehirnen identifiziert hatten. Das längere Protein war dabei identisch mit dem zuvor entdeckten NACP. Da beide Proteine wiederum Ähnlichkeiten mit dem Synuclein des *Torpedo californica* aufwiesen, wurden sie als humanes α - und β -Synuclein bezeichnet (Jakes et al. 1994). 1997 erfolgte die Entdeckung eines 127 Aminosäuren langen Proteins als potentieller Brustkrebsmarker, das eine 55%ige Übereinstimmung mit α -Synuclein aufwies und dementsprechend als γ -Synuclein bezeichnet wurde (Ji et al. 1997).

3.2.2 Expression und Proteinstruktur

α -Synuclein wird durch das SNCA Gen auf dem langen Arm des Chromosoms 4 kodiert (Spillantini et al. 1995). Es wird hauptsächlich in neuronalem Gewebe exprimiert (Jakes et al. 1994; Lavedan 1998), findet sich allerdings auch in Zellen des hämatopoetischen Systems (Shin et al. 2000) und im geringeren Ausmaß in anderen Gewebstypen, wie Pankreas, Niere oder Skelettmuskulatur (Lavedan 1998). α -Synuclein lässt sich fast ausschließlich in präsynaptischen terminalen Nervenendigungen nachweisen, in denen es sich in der Nähe der synaptischen Vesikel befindet (Irizarry et al. 1996; Iwai et al. 1995).

α -Synuclein ist ein 140 Aminosäuren langes und 14,5kDa schweres Protein und setzt sich aus drei verschiedenen funktionellen Regionen zusammen. Der N-Terminus (Aminosäure 1-60) weist amphipathische Eigenschaften auf und ist durch sechs inkomplette Wiederholungen der Konsensussequenz KTKEGV gekennzeichnet

(Maroteaux et al. 1988). Die mittlere Region (61-95) besteht aus der NAC Sequenz (Ueda et al. 1993). Sie stellt den hydrophobsten Anteil des Proteins dar und wird für die α -Synuclein Aggregation und die β -Faltblatt-Formation verantwortlich gemacht (Giasson et al. 2001). Die überwiegend negativ geladene C-Terminussequenz (95-140) als dritte Region besitzt möglicherweise eine Chaperonefunktion und beeinflusst die α -Synuclein Fibrillierung (Kim et al. 2002; Murray et al. 2003). Rekombinantes α -Synuclein bildet in wässriger Lösung keine konsistente Sekundärstruktur. Endogenes α -Synuclein könnte daher intrazellulär als nativ ungefaltetes Monomer vorliegen (Weinreb et al. 1996). Das hydrophobe Aminoende und die NAC Region, sowie die subzelluläre Lokalisation des α -Synucleins weisen aber auf eine Interaktion mit Phospholipidmembranen durch Bildung einer α -helikalen Sekundärstruktur hin (Davidson et al. 1998). Neueste Untersuchungen legen dagegen nahe, dass unter nicht denaturierenden Bedingungen isoliertes und analysiertes endogenes α -Synuclein aus neuronalen und nicht neuronalen Zelllinien, Hirngewebe und lebenden humanen Zellen hauptsächlich als ein 58kDa schweres α -helikal-gefaltetes Tetramer vorliegt (Bartels et al. 2011). Das Tetramer bildet demnach die vorherrschende physiologische Zustandsform des α -Synucleins neben dem Vorkommen geringer Mengen Mono-, Di- und Trimeren.

3.2.3 Physiologische Funktion

Die genaue physiologische Funktion des α -Synucleins ist bis heute ungeklärt. Auf Grund seiner Lokalisierung in der Präsynapse und seiner Fähigkeit mit Phospholipiden zu interagieren, wird α -Synuclein eine wichtige Rolle in der membran-assoziierten Vesikelprozessierung der Synapse zugesprochen (Auluck et al. 2010). α -Synuclein knockout Mäuse zeigen in dopaminergen Projektionen beispielsweise eine gesteigerte Neurotransmitterausschüttung nach elektrischer Nervenstimulation, als Hinweis für eine aktivitätsabhängige negative Regulation der Neurotransmission durch α -Synuclein (Abeliovich et al. 2000). Konsequenterweise führt eine Depletion von α -Synuclein in primärem hippocampalen Neuronen durch *antisense* Oligonukleotide zu einer Verminderung des Vesikelpools in der Präsynapse (Murphy et al. 2000). Mehrere Untersuchungen zeigten, dass α -Synuclein durch Integration in die Membran von Vesikeln den Krümmungsgrad bzw. die Oberflächenspannung dieser vermindert und somit die Fusion der stabilisierten Vesikelmembran mit der flachen Plasmamembran der Präsynapse erschwert. Dadurch reguliert α -Synuclein indirekt die Transmitter-

ausschüttung (Kamp and Beyer 2006; Nuscher et al. 2004; Perlmutter et al. 2009). α -Synuclein interagiert zudem mit mehreren anderen Proteinen (Norris et al. 2004) und kann die Aktivität verschiedener Enzyme regulieren, wie die der Tyrosin-Hydroxylase, dem Schlüsselenzym der Dopaminproduktion (Peng et al. 2005; Perez et al. 2002), oder der Phospholipase D, einem Phospholipide spaltendem Enzym (Ahn et al. 2002). Auf Grund seiner physikalischen und funktionellen Homologie zu 14-3-3 Proteinen, einer Familie ubiquitär im Zytoplasma vorkommender Chaperone, wird α -Synuclein auch eine Chaperon-gleiche Wirkung zugesprochen (Ostrerova et al. 1999). Im juvenilen Gehirn von Singvögeln wird α -Synuclein spezifisch in bestimmten neuronalen Nervenendigungen während des Erlernens des Vogelgesangs exprimiert, was auf eine zusätzliche Rolle des α -Synucleins in der neuronalen Plastizität hinweisen könnte (George et al. 1995).

3.2.4 Pathophysiologische Aspekte

Ins Interesse der neurodegenerativen Forschung trat α -Synuclein zunächst mit der Entdeckung der NAC Sequenz (Ueda et al. 1993) und schließlich durch seinen Nachweis in Lewy-Körperchen und Neuriten (Braak et al. 1999; Spillantini et al. 1997). Den eindrücklichsten Beweis für die essentielle Rolle des α -Synucleins in der Pathogenese der Parkinsonerkrankungen lieferte aber der kausale Nachweis zwischen seltenen genetischen Mutationen und der Krankheitsmanifestation. So folgte schon vor Spillantinis Entdeckung der Nachweis einer Punktmutation im SNCA Gen in einer italienisch-amerikanischen bzw. in drei griechischen Familien (Mutation: A53T) (Polymeropoulos et al. 1997) und später einer weiteren Mutation in einer deutschen Familie (A30P) (Kruger et al. 1998) mit autosomal-dominant vererbtem Parkinsonsyndrom. Diese familiären Formen zeichnen sich durch einen frühen Krankheitsbeginn vor dem 50. Lebensjahr, einem zunächst einseitigen Auftreten der Bradykinese und des Rigors und einem guten Ansprechen auf Dopaminsubstitution aus. Die Erkrankung verläuft allerdings im Vergleich zum IPS wesentlich progressiver und zeigt häufig eine frühe dementielle Entwicklung ähnlich der Demenz von Lewy-Körper-Typ (Bostantjopoulou et al. 2001). Später folgte die Entdeckung, dass auch durch Multiplikation des SNCA Locus (Duplikation und Triplikation des Gens) ein autosomal-dominantes familiäres Parkinsonsyndrom ausgelöst werden kann (Chartier-Harlin et al. 2004; Ibanez et al. 2004; Singleton et al. 2003). Eine 50%ige Zunahme der α -Synuclein Expression reicht demnach schon zur Krankheitsentwicklung aus. Die Anzahl der SNCA Kopien

korrelieren dabei zusätzlich mit der Schwere und dem frühen Beginn der Erkrankung im Sinne eines Gen-Dosis-Effekts (Eriksen et al. 2005). Eine weitere *missense* Punktmutation (E46K) wurde schließlich 2004 in einer spanischen Familie mit familiärem Parkinsonsyndrom mit Demenz gefunden (Zarranz et al. 2004). Darüber hinaus haben mittlerweile mehrere genomweite Assoziationsstudien Korrelationen zwischen mehreren *single nucleotide polymorphisms* (SNPs) im SNCA und dem IPS nachweisen können (Mata et al. 2010; Satake et al. 2009; Simon-Sanchez et al. 2008).

Es besteht heute Einigkeit darüber, dass eine Veränderung der α -Synuclein Expression oder das Vorliegen von Mutationen im SNCA Gen einen toxischen Effekt auf dopaminerge bzw. allgemein katecholaminerge Zellen hat. α -Synuclein Monomere reagieren unter bestimmten extrinsischen oder intrinsischen Bedingungen miteinander, bilden sich vorübergehend zu noch löslichen Protofibrillen aus (eine heterogene Mischung aus Oligomeren mit β -Faltblatt-Struktur), um schließlich stabile amyloide Fibrillen zu formen, wie sie in-vivo in Lewy-Körperchen zu finden sind (Volles and Lansbury 2003). Dabei verdichten sich die Hinweise, dass nicht die fertigen reifen Fibrillen, sondern bestimmte Formen von Oligomeren, als Zwischenstufen oder Nebenprodukte des Fibrillierungsprozesses, das eigentliche zelltoxische Potential tragen (Uversky 2010). Diese Hypothese läuft analog zu der Erkenntnis, dass bestimmte Vorstufen anderer Amyloid formender Proteine, wie das A β Peptid bei Morbus Alzheimer, toxische Eigenschaften besitzen (Lashuel et al. 2002). Die Beobachtung, dass A30P- α -Synuclein eher dazu neigt zu Oligomeren zu akkumulieren als zu reifen Fibrillen, unterstützt diese Annahme (Conway et al. 2000). Mittlerweile hat sich gezeigt, dass die Punktmutationen im SNCA Gen auf unterschiedlicher Art und Weise die Bildung von Oligomeren begünstigen, ohne dabei zwangsläufig die Fibrillierungsrate zu steigern (Conway et al. 2000). So führt der Ersatz von Alanin zu Threonin an Stelle 53 des A53T- α -Synucleins zu einer Ausweitung der hydrophoben Domäne in der N-Terminalen Region und steigert im Sinne einer *gain-of-function* Mutation die Bildung von β -Faltblatt-Strukturen (Narhi et al. 1999). Auch die A30P und E46K Mutationen verschieben das Konformationsgleichgewicht des monomeren α -Synucleins in Richtung höher strukturierter Zustandsformen mit β -Faltblattanteilen (Brucato et al. 2009). Dabei handelt es sich um einen wichtigen gemeinsamen Schritt, der allen Aggregationsprozessen, einschließlich der Bildung jeglicher Typen von Oligomeren oder Fibrillen, zu Grunde liegt (Apetri et al. 2006). Neben den Punktmutationen können eine Reihe anderer molekularbiologischer Faktoren das

Konformationsverhalten des α -Synucleins beeinflussen (Uversky 2007). Hierunter fallen beispielsweise die posttranslationale Modifikation des Proteins durch oxidative Nitrierung (Duda et al. 2000) oder kinase-abhängige Phosphorylierung (Fujiwara et al. 2002), die exogene Zufuhr von Toxinen (z.B. Rotenon und Paraquat) (Manning-Bog et al. 2002) oder Schwermetallionen, wie Eisen und Mangan (Uversky et al. 2001). Zusätzliche Beweise für die Toxizität der Oligomere liefern in-vitro und in-vivo Versuche. In den meisten Zellkulturmodellen zeigt sich die Toxizität ohne das Auftreten höher aggregierter α -Synucleinformen (Xu et al. 2002) bzw. findet die Bildung von reifen α -Synucleinablagerungen zeitlich erst nach den ersten Zeichen eines beginnenden Zelltodes statt (Gosavi et al. 2002). Nach lentiviraler Injektion von Oligomer- oder Fibrillen-bildenden α -Synuclein-Mutanten in die SNpc von Ratten wurde der schwerste dopaminerge Zellverlust durch die Oligomer-bildende Mutante hervorgerufen (Winner et al. 2011). Angesichts dieser Befunde postulieren heute einige Autoren, dass die Formierung von reifen, unlöslichen Fibrillen in Lewy-Körperchen nicht die Ursache der Neurodegeneration darstellt, sondern die Zelle sich dadurch vor dem toxischen Potential der Protofibrillen schützt (Goldberg and Lansbury 2000; Olanow et al. 2004).

Das zelltoxische Potential erlangen die Oligomere möglicherweise durch eine Veränderung der Permeabilität von Membranen (Waxman and Giasson 2009). So integrieren sich annulär geformte Oligomere als Poren bzw. Kanäle in Membranen und führen zu einer unkontrollierten Durchlässigkeit für Moleküle (Kostka et al. 2008; Lashuel et al. 2002). Oligomere steigern zudem nachweislich die Leitfähigkeit von Doppelmembranen für Ionen auch ohne Bildung porenartiger Strukturen (Kayed et al. 2004). Es konnte gezeigt werden, dass in monoaminergen Neuronen α -Synuclein-assoziierten Membranprozesse zu einem Ausströmen oxidierbarer Monoamine aus synaptischen Vesikeln (z.B. Dopamin) in das Zytosol führen (Lotharius and Brundin 2002). Dopamin ist selbst ein hochreaktives Molekül, das durch seine eigene Metabolisierung im Zytosol reaktive Sauerstoffspezies freisetzen kann (Hastings et al. 1996). Durch die α -Synuclein induzierte Störung der Membranintegrität der Vesikel, akkumuliert Dopamin im Zytosol und führt durch Auto- oder enzymvermittelter Oxidation zur Produktion reaktiver Sauerstoffradikale, die wiederum die Konformation und Aggregationsfähigkeit des α -Synucleins beeinflussen (Caudle et al. 2008). Hieraus ergibt sich eine Dopamin-abhängige Neurotoxizität des α -Synucleins, die auch eine

Erklärung für die selektive Vulnerabilität dopaminerger bzw. monoaminerger Zellen in der Pathogenese des IPS liefert (Xu et al. 2002).

In den 1990iger Jahren wurden dopaminerge Zellen aus embryonalem Mittelhirngewebe in das Striatum einiger Patienten mit IPS transplantiert (Brundin et al. 2010). Überraschenderweise zeigte sich bei der Autopsie einiger Gehirne der transplantierten Patienten 11-14 Jahre später die Lewy-Körperchen-Pathologie nicht nur im patienteneigenen, sondern auch im ehemals transplantierten embryonalem Hirngewebe (Kordower et al. 2008; Li et al. 2010). Konsequenterweise wurde daraus geschlossen, dass die Lewy-Körperchen-Pathologie von den pathologisch veränderten Empfängerzellen auf die gesunden Spenderneuronen übertragen worden sein musste (Olanow and Prusiner 2009). Ausführliche in-vitro und in-vivo Studien haben gezeigt, dass α -Synuclein von Nervenzellen, die das Protein überexprimieren, in benachbarte embryonale Stammzellen via Endozytose transferiert werden kann, dort die Bildung von Lewy-ähnlichen Einschlusskörperchen induziert und zur Zelldegeneration führt (Desplats et al. 2009). Diese außergewöhnlichen Befunde lassen sich möglicherweise auch mit der schon beschriebenen Hypothese von Braak und Kollegen (siehe Kapitel *Pathophysiologie und Pathogenese*) in Einklang bringen (Steiner et al. 2011). Danach schreitet die Lewy-Pathologie in einem stadienhaften Verlauf nach einem stereotypen Muster von einer Hirnregion zur andern fort (Braak et al. 2003). Braak und Kollegen postulieren dabei die Existenz einer exogenen, neurotrophen und pathogenen Substanz, welche die Krankheit induziert und für die sequentielle Ausbreitung in miteinander verbundenen vulnerablen Zellpopulationen sorgt. Als Eintrittspforten für das möglicherweise virale Pathogen dienen dabei das olfaktorische Epithel und das enterische Nervensystem (*dual-hit* Hypothese) (Hawkes et al. 2007). Obwohl α -Synuclein wahrscheinlich nicht das initiale Pathogen darstellt, ist es vielleicht das initiale Ziel des unbekannten Pathogens (Steiner et al. 2011). All diese Befunde und Annahmen erklären mit hoher Wahrscheinlichkeit das Auftreten der Lewy-Pathologie in den transplantierten embryonalen Zellen bei Parkinsonpatienten. Sie legen zudem den Schluss nahe, dass α -Synuclein möglicherweise analog zum Prionprotein andere Zellen transfizieren, sowie in diesen seine eigene Pathogenität selbst induzieren kann (Olanow and Prusiner 2009).

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass α -Synuclein zweifelsohne eine essentielle Rolle in der Pathogenese des IPS spielt. Während die seltenen familiären Mutationen im SNCA Gen einen offensichtlichen Grund für das gesteigerte

Vorkommen abnormal gefalteter α -Synucleinformen liefern, bewirkt wahrscheinlich eine individuell sehr unterschiedliche Kombination aus Einflussfaktoren (u.a. Zellalterung, oxidativer Stress, Entzündungsreaktionen, Umweltgifte, genetische Polymorphismen und fehlerhafter Proteinabbau) eine gestörte α -Synucleinmetabolisierung, die das sporadische IPS letztlich hervorruft. Die hier aufgeführten Forschungsergebnisse wurden nach größtmöglicher Aktualität ausgesucht, können aber nur einen Bruchteil des Wissens zu α -Synuclein und der Pathogenese des IPS wiedergeben.

3.3 Natürlich vorkommende Autoantikörper gegen α -Synuclein

3.3.1 Einführung: natürlich vorkommende Autoantikörper

Unter natürlich vorkommenden Autoantikörpern versteht man eine Subklasse von Antikörper, die sich dadurch auszeichnen, dass sie in Abwesenheit einer spezifischen Antigenstimulation, sprich ohne klassische Immunisierung, entstehen und mit einer Reihe körpereigener Antigene reagieren können (Avrameas 1991; Shoenfeld et al. 2007). Ihre Existenz widerspricht der allgemein akzeptierten Theorie der klonalen Selektion von Burnet, nach der eine B-Zelle genetisch so programmiert ist, auf Präsentation eines exogenen Antigens nur eine molekulare hochspezifische Spezies eines bestimmten Antikörpers zu produzieren (Burnet 1976). Im Gegensatz zu solchen hochspezifischen monoreaktiven induzierten Antikörpern, weisen natürliche Autoantikörper einige deutliche Unterschiede auf. Sie können sich bereits in der prä-immunen Phase des Organismus bilden, d.h. vor der ersten Exposition mit exogenen Antigenen. In Mäusen, die unter absolut sterilen Bedingungen geboren wurden, lassen sich Antikörper-produzierende B-Zellen extrahieren, die auf intrazelluläre Autoantigene reagieren (Underwood et al. 1985). Im Serum neugeborener Menschen finden sich Antikörper verschiedener Klassen, die ebenfalls in Abwesenheit externer Stimuli, schon mehr als 300 nachgewiesene körpereigene Strukturen erkennen (Merbl et al. 2007). Natürliche Autoantikörper setzen sich aus Isotypen der Immunglobulin (Ig) Klassen M, G und A zusammen (Lacroix-Desmazes et al. 1998). Der IgM Typ dominiert vorwiegend in der neonatalen Phase (Kearney and Vakil 1986), während im adulten Serum IgG überwiegt (Avrameas 1991). Das Repertoire an autoreaktiven IgG baut sich zwischen dem 2. und 4. Lebensjahr auf. Interessanterweise zeigt es zwischen Kindern im Allgemeinen eine ausgesprochen hohe Homogenität und ist dem Repertoire

Erwachsener sehr ähnlich (Lacroix-Desmazes et al. 1998). Auch bei der weiteren Untersuchung autoreaktiver IgG und IgM gesunder Probanden, vom Kleinkind bis zum alten Menschen, bleibt das Repertoire zwischen den Individuen innerhalb der jeweiligen Altersgruppe hoch konserviert und zwischen den Altersgruppen homogen (Lacroix-Desmazes et al. 1995; Mouthon et al. 1995; Mouthon et al. 1996). Im Gegensatz zu den natürlichen Autoantikörpern weist das Repertoire reaktiver Antikörper gegen Fremdanigene, die durch klonale Selektion gebildet werden, in jungen Erwachsenen eine hohe und unter älteren Menschen eine noch deutlichere Diversität auf – abhängig von der Geschichte jedes individuellen Immunsystems (Lacroix-Desmazes et al. 1995). Einige Studien zeigen eine generelle Zunahme des Repertoires an natürlichen autoreaktiven Antikörpern im Alter (Candore et al. 1997; Manoussakis et al. 1987). Die Autoantikörper richten sich vor allem gegen phylogenetisch hoch konservierte intra- und extrazelluläre Autoantigene, wie Aktin, Tubulin, Keratin, Albumin und Insulin (Avrameas 1991). Sie erkennen nicht nur körpereigene Strukturen, unterlaufen damit also die immunologische Toleranzentwicklung, sondern zeichnen sich durch eine mitunter ausgeprägte Polyreaktivität gegenüber vielen unterschiedlichen, auch körperfremden Molekülen aus (Lacroix-Desmazes et al. 1998; Notkins 2004). Polyreaktivität bedeutet allerdings nicht den Verlust von Spezifität, da jeder natürliche Autoantikörper nur sein spezifisches Set an Epitopen umfasst und damit einzigartig ist (Ternynck and Avrameas 1986). Im Schnitt können natürliche Autoantikörper mit mehr als zwei Antigenen reagieren, obwohl auch monospezifische Autoantikörper mit nur einem Antigen vorkommen können (Avrameas 1991). Ihre Polyreaktivität begründet sich wahrscheinlich in der besonderen Flexibilität der Antigenbindungsdomäne (Notkins 2004). Die Affinität eines polyreaktiven Autoantikörpers ist bezüglich der verschiedenen Antigene extrem unterschiedlich und im Vergleich zu monoreaktiven Antikörpern und ihren passenden Antigenen meist deutlich geringer (Notkins 2004). Ein wesentliches Unterscheidungskriterium zwischen monoreaktiven induzierten und natürlich vorkommenden Antikörpern findet sich auf sequenziellen Ebene der variablen Domänen V_H und V_L . Die Aminosäure- bzw. die korrespondierenden Nukleotidsequenzen der variablen Domänen von natürlichen Autoantikörpern sind mit der Keimbahnsequenz der zugehörigen V Gene identisch oder enthalten eine begrenzte Anzahl an somatischen Mutationen (Baccala et al. 1989; Chen et al. 1991; Sanz et al. 1989; Siminovitch et al. 1989). Eine Affinitätsreifung durch graduelle Häufung somatischer Mutationen der V_H und V_L Region wie bei exogen induzierten Antikörper, die zu einer zunehmende Rigidität der antigenbinden Domäne

und einer spezifischen Antigenerkennung führt, findet demnach nicht statt (Jimenez et al. 2004).

Natürlich vorkommende Autoantikörper in gesunden Individuen scheinen trotz ihrer Reaktion auf körpereigene Komponenten keine primäre pathologische Bedeutung zu haben, auch wenn sie z.B. im Fall des Thyreoglobulins auch Zielantigene von Autoantikörpern in Autoimmunerkrankungen erkennen (Lacroix-Desmazes et al. 1998; Piechaczyk et al. 1987). Pathogene Autoantikörper in Autoimmunerkrankungen sollen vorzugsweise vom IgG Typ sein. Sie sind durch hoch-mutierte V Gene codiert und binden dementsprechend mit hoher Affinität an ihr Autoantigen, bei sonst nur minimaler Oligoreaktivität (Elkon and Casali 2008). Inwiefern natürliche Autoantikörper in pathologischen Autoimmunprozessen eine Rolle spielen bzw. ob pathogene Autoantikörper sich aus natürlichen Autoantikörper entwickeln, bleibt ungeklärt (Avrameas 1991). Die Grenze zwischen natürlichen und pathogenen Autoantikörpern ist daher trotz der zuvor erwähnten Unterschiede nicht eindeutig definiert (Lacroix-Desmazes et al. 1998).

3.3.2 Physiologische Bedeutung von natürlichen Autoantikörpern

Über die physiologische Bedeutung der natürlichen Autoantikörper herrscht bis heute Uneinigkeit. Am ehesten wird man der Fülle an postulierten Funktionen mit einer differenzierten exemplarischen und ontogenetisch begründeten Sichtweise gerecht. Als erste Tiere in der Evolution besaßen Knorpelfische vor 450 Millionen Jahren, darunter Vorfahren heutiger Haie, die Fähigkeit Immunglobulin-ähnliche Moleküle zu bilden (Marchalonis et al. 2006). In Analogie zu den oben beschriebenen natürlichen Antikörpern des Menschen sind diese Moleküle ebenfalls durch Keimbahngene enkodiert und weisen eine ausgesprochene Polyspezifität in der Erkennung von Fremd- und Eigenantigenen auf (Marchalonis et al. 2002; Marchalonis et al. 1998). Haie besitzen kein adaptives Immunsystem im klassischen Sinne, statt dessen steigern sie bei Bedarf die Produktion ihrer natürlichen polyreaktiven Antikörper (Marchalonis et al. 2006). Einige Autoren postulieren, dass mit der Entwicklung polyreaktiver Antikörpern, die durch positive Selektion autoreaktiver B-Zellen entstehen, eine evolutionär wichtige Spezifizierung im Rahmen der primären Abwehr von äußeren Pathogenen geschaffen wurde (Baumgarth et al. 2005). Eine alternative Erklärung dazu ist, dass mit der Entstehung des dritten inneren Keimblatts in primitiven Vertebraten sich autoreaktive Antikörper zur spezifischen Beseitigung körpereigener Abbauprodukte aus mesodermalen und mesenchymalen Gewebe bildeten (Lutz

2007). Der Zweck eines sich so entwickelnden Immunsystems bestand demnach noch nicht in der strengen Elimination autoreaktiver B-Zellklone und der Ausdifferenzierung hochaffiner Antikörper-Antigen-Bindungen, sondern in der Schaffung eines fein justierten und einfachen Systems zur Aufrechterhaltung der Gewebshomöostase (Rowley et al. 2007).

Zur Aufrechterhaltung einer Gewebshomöostase tragen natürliche Autoantikörper auf vielfältige Weise bei. Sie nehmen durch Opsonisierung, Komplementrekrutierung und durch proteolytische Aktivität am Abbau alternder Zellen und an der Entfernung veränderter Zell- und Plasmakomponenten teil. Sie spielen eine wichtige Rolle in der Anti-Tumor-Überwachung und besitzen anti-inflammatorische Eigenschaften durch Bindung von oxidativ veränderten Strukturen und Neutralisierung proinflammatorischer Zytokine (Lutz et al. 2009). Darüber hinaus besitzen einige Autoantikörper immunmodulatorische Wirkung. So binden natürlich vorkommende Autoantikörper beispielsweise an die „Scharnier-Region“ (*IgG anti-hinge region natural antibodies*) von Antigen-bindenden Immunglobulinen auf B-Zellmembranen und inhibieren dadurch die weitere B-Zell-Aktivierung (Terness et al. 2002).

3.3.3 Natürliche Autoantikörper bei neurodegenerativen Erkrankungen: Beispiel Alzheimer Demenz

Auch im Kontext neurodegenerativer Erkrankungen zeigen Studien die Existenz natürlich vorkommender Autoantikörper, die möglicherweise in der physiologischen Beseitigung pathogener, z.B. fehlgefalteter oder aggregierter Peptide eine wichtige Rolle spielen (Neff et al. 2008). Bei der Alzheimer Demenz wurden solche Autoantikörper mittlerweile näher charakterisiert. Die Ergebnisse sollen daher im Folgenden kurz vorgestellt werden.

Beim der Alzheimer Demenz handelt es sich um die häufigste Demenz beim alten Menschen. Die Entstehung der Alzheimer Demenz ist mit der Formierung von extrazellulären Amyloidplaques und intrazellulären neurofibrillären Veränderungen (Neurofibrillen-bündel) in kortikalen Hirnregionen assoziiert. Die Neurofibrillenbündel bestehen aus Tau-Protein, ein Mikrotubuli assoziiertes Protein, dessen Hyperphosphorylierung zu einer Disintegration und strukturellen Dysfunktion des Proteins führt (Mandelkow et al. 2007). Aβ, ein 38 bis 43 langes Aminosäuren Peptid, entsteht durch enzymatische Spaltung aus einem größeren membrangebunden Vorläuferprotein, dem *amyloid precursor protein* (APP),

und aggregiert zu den unlöslichen Amyloidplaques (Hardy 2006). In transgenen Mausmodellen konnte gezeigt werden, dass durch aktive Immunisierung mit prä-aggregiertem A β 42 (Schenk et al. 1999) oder passiver Immunisierung mit extern hergestellten Antikörpern gegen A β (Bard et al. 2000) die Amyloidplaques im Mausgehirn reduziert werden konnten und es zu einer Verbesserung der Gedächtnisleistung der Tiere kam (Morgan et al. 2000). Vor dem Hintergrund dieser Ergebnisse wurden im humanem Liquor und Plasma natürlich vorkommende Autoantikörper gegen A β detektiert (Du et al. 2001). In initialen Studien zeigte sich, dass die Autoantikörpertiter bei Alzheimer-Patienten im Vergleich zu gesunden Kontrollprobanden sowohl im Liquor, als auch im Serum deutlich geringer ausfielen. Dem Autoantikörper kommt daher möglicherweise eine pathogenetische Bedeutung zu (Brettschneider et al. 2005; Du et al. 2001; Weksler et al. 2002). Diese natürlich vorkommenden Autoantikörper bestehen aus einer heterogenen polyklonalen Gruppe, die A β Fibrillen (O'Nuallain et al. 2006), A β Oligomere (O'Nuallain et al. 2008), redoxmodifizierte A β Oligomere (Moir et al. 2005) und A β Monomere (Du et al. 2003) erkennen können. A β Autoantikörper zeigen einen neuroprotektiven Effekt, da sie die Fibrillierung und Neurotoxizität der A β Peptide nachweislich reduzieren (Dodel et al. 2011; Du et al. 2003). Eine Substitution der natürlichen Autoantikörper gegen A β , so die Rationale, könnte daher therapeutisches Potential besitzen. In kommerziell erhältlichen Immunglobulinpräparaten (IVIg: intravenöse Immunglobuline), die zu therapeutischen Zwecken hergestellt wurden, lassen sich Autoantikörper gegen A β nachweisen (Dodel et al. 2002). Bei IVIg handelt es sich um eine konzentrierte Lösung humaner Antikörper vorzugsweise der Klasse IgG und wenigen IgM und IgA aus dem Plasma von mehr als zehntausend gesunden Spendern (Lutz et al. 2009). In zwei Pilotstudien wurde der Effekt einer IVIg Infusionstherapie bei Alzheimer-Patienten untersucht (Dodel et al. 2004; Relkin et al. 2009). In beiden Studien zeigte sich eine Veränderung der Serum- und Liquorkonzentration des totalen A β Peptids, als Hinweis für eine A β Mobilisierung aus dem zentralen Nervensystem in die periphere Zirkulation. Der kognitive Status, gemessen mit dem Mini Mental Status, *ADAS-cog* und Aufgaben zur visuell-räumlichen Konstruktion, zeigten eine leichte Verbesserung für die Zeit der Therapie. Auf Grund der kleinen Fallzahl der Pilotstudien und dem Studiendesign kann daraus allerdings noch kein kausativer Effekt des Therapeutikums postuliert werden. Weitere klinische Studien unter Placebo-kontrollierten Bedingungen sind in der Durchführung (Dodel et al. 2010). Trotz der positiven Ergebnisse, bleibt offen, ob tatsächlich die natürlichen Autoantikörper gegen A β oder andere allgemeine

immunmodulatorische Effekte des IVIg für die Veränderungen bei Alzheimer-Patienten verantwortlich sind (Dodel et al. 2010; Neff et al. 2008).

3.3.4 Beschreibung des α -Synuclein Autoantikörpers

Eine erstmalige Beschreibung natürlich vorkommender Autoantikörper gegen α -Synuclein erfolgte 2007 durch Papachroni und Kollegen (Papachroni et al. 2007). Hier wurde die Prävalenz von Autoantikörpern gegen α -, β - und γ -Synuclein bei Patienten mit familiärem und idiopathischen/sporadischen Parkinsonsyndrom und gesunden Kontrollen durch Inkubation des Serums mit dem jeweiligen rekombinant hergestellten Synuclein im Western-Blot untersucht. Die Detektion von β - und γ -Synuclein zeigte keine Assoziation bei Parkinson-Patienten. Serum Autoantikörper gegen α -Synuclein fanden sich dagegen bei 90% der familiären Parkinson-Patienten, 48% der idiopathischen Parkinson-Patienten und nur in 31% der gesunden Kontrollen. Ein statistischer Unterschied zwischen der Autoantikörperprävalenz der untersuchten Gruppe ergab sich allerdings nur zwischen familiären Parkinsonformen und gesunden Kontrollen. Patienten mit sporadischem Parkinsonsyndrom und gesunde Kontrollen unterschieden sich nicht signifikant. Eine Korrelation zwischen dem Vorkommen der Autoantikörper und dem Alter und Geschlecht der Patienten, dem Alter bei Krankheitsbeginn, der Krankheitsschwere und diversen Umweltfaktoren (Pestizidexposition, Schädelhirntrauma und Rauchen) konnte nicht gefunden werden. Die isolierten Autoantikörper erkannten mehrere Epitope des α -Synuclein Proteins. α -Synuclein ist demnach als ganzes Protein autoimmunogen. Die gefundene Antikörperreaktion gegen α -Synuclein entsteht daher nicht durch eine zufällige Kreuzreaktion gegen ein α -Synuclein-Epitop, das Ähnlichkeiten mit einem anderen Protein aufweist, gegen das der Antikörper ursprünglich gebildet wurde. Analog den Autoantikörpern gegen A β konnten α -Synuclein Autoantikörper auch in IVIg nachgewiesen werden (Patrias et al. 2010). Diese IVIg Autoantikörper erkannten spezifisch das α -Synuclein Monomer und lösliche Oligomere im ELISA. Nach Aufreinigung mittels Affinitätschromatographie konnten diese Autoantikörper genauer charakterisiert werden (unveröffentlichte Daten). In humanen Hirnschnitten lassen sich Lewy-Körperchen immunhistochemisch mit affinitäts-gereinigten Autoantikörper visualisieren (Neff et al. 2008). Eine Epitopcharakterisierung des IVIg Autoantikörpers bestätigte zunächst die Autoimmunogenität des ganzen α -Synuclein Proteins mit Ausnahme der C-Terminalen Domäne. Eine genauere Untersuchung mittels SPOT

Technologie, bei der das α -Synuclein als eine Anordnung überlappender Peptidsequenzen dargestellt wird, zeigte sich eine hochspezifische Bindung einer Epitopsequenz (Aminosäuren 74-79) innerhalb der NAC Region (unveröffentlichte Daten). Affinitäts-gereinigte Autoantikörper haben zudem einen inhibitorischen Effekt auf die α -Synuclein Fibrillierung und reduzieren spezifisch die α -Synuclein induzierte Toxizität in neuronalen Zellkulturen (unveröffentlichte Daten). Die Effektivität einer passiven Immunisierung mittels eines Autoantikörpers gegen α -Synuclein oder einer IVIG-Therapie bei Parkinson wurde bislang nicht untersucht. Eine aktive Immunisierung mittels humanem α -Synuclein zeigte in transgenen Parkinson-Mausmodellen erste Erfolge in der Reduktion neuronaler α -Synucleinaggregate (Masliah et al. 2005).

Parallel zu der vorgelegten Arbeit erschien eine erste Studie, die sich mit der Messung des natürlichen Autoantikörpers gegen α -Synuclein zur möglichen diagnostischen Evaluierung befasste (Yanamandra et al. 2011). Hier fanden sich signifikant gesteigerte Titer des Autoantikörpers in Parkinson-Patienten im Vergleich zu gesunden Kontrollprobanden. Eine eingehende Vorstellung dieser Studie soll im Kapitel *Diskussion* vor dem Hintergrund der eigenen Ergebnisse erfolgen.

3.4 Biomarkerforschung beim idiopathischen Parkinsonsyndrom

3.4.1 Definition: Biomarker

Unter einem Biomarker (auch biologischer Marker) versteht man nach Konsensusdefinition eine objektiv messbare Eigenschaft, die als Indikator für einen normal biologischen oder pathogenen Prozess oder eine pharmakologische Reaktion auf eine therapeutische Intervention verwendet werden kann (Biomarkers Definitions Working Group 2001). Unter dieser Voraussetzung können Biomarker gemäß der *Biomarkers Definition Working Group* folgendermaßen eingesetzt werden:

- als diagnostisches Instrument zur Identifikation von Patienten mit einer Erkrankung oder abnormalen Befunden
- zur Beurteilung der Ausbreitung (*staging*) und Schwere der Erkrankung
- als Indikator für die Krankheitsprognose
- zur Bewertung und Überwachung des klinischen Ansprechens nach oder während einer therapeutischen Intervention.

Gerade letzterer Punkt setzt eine kritische Abgrenzung zwischen Biomarkern im Allgemeinen und sogenannten Surrogatmarkern voraus. Surrogatmarker sind eine Untergruppe aller Biomarker, die in Therapiestudien dazu verwendet werden können einen klinisch wichtigen Endpunkt, der erwartungsgemäß den Effekt einer therapeutischen Intervention anzeigt, zu ersetzen (De Gruttola et al. 2001). Biomarker werden in vielen Feldern der Medizin eingesetzt. Ein gängiges Beispiel ist ihre Verwendung zur Diagnose eines myokardialen Infarkts oder die Evaluierung der Schwere einer Entzündungsreaktion (Thomas 2007). Dabei sind Biomarker nicht auf ihre Art festgelegt. Verwendung als Biomarker finden unter anderem in Körperflüssigkeiten gemessene Parameter (fluide Biomarker), physikalisch-mechanisch messbare Größen oder Daten aus bildgebenden Untersuchungen. Idealerweise sollte ein Biomarker einfach und kostengünstig zu gewinnen sein. Einfache Analysen von Blut, Urin oder Speichel sind daher komplexeren Prozeduren wie dem Neuroimaging oder der Analyse von aufwendig zu bekommenden Gewebs- oder Liquorproben vorzuziehen (Noelker et al. 2011). Die US Food and Drug Administration (FDA) erweitert in ihren Leitlinien die Definition von Biomarkern um eine kategorische Einteilung, in der je nach wissenschaftlicher Evidenz *wahrscheinlich* oder *bekannt valide* Marker differenziert werden können (FDA 2005). Allgemein hat sich in der praktischen Anwendung gezeigt, dass ein Biomarker mindestens eine 80%ige Sensitivität im Erkennen der relevanten Eigenschaft und mindestens eine 80%ige Spezifität in der Abgrenzung zu irrelevanten Eigenschaften besitzen muss (Noelker et al. 2011; Schlossmacher and Mollenhauer 2010).

3.4.2 Notwendigkeit von Biomarkern beim IPS

Nach den Kriterien der *Biomarkers Definition Working Group* sollte ein oder mehrere Biomarker für das IPS die frühe klinische Diagnose validieren (oder erst ermöglichen), Auskunft über die Schwere des pathogenen Prozesses geben (z.B. das Ausmaß des dopaminergen Zellverlusts), eine prognostische Aussage aufweisen und den Effekt einer Therapie anzeigen können. Insbesondere in frühen Stadien können andere Störungen, wie der essentielle Tremor oder sekundäre Parkinsonsyndrome, das IPS imitieren (Breen et al. 2011). In ähnlicher Weise kann es schwierig sein das IPS von atypischen Parkinsonsyndromen mit wesentlich schlechterer Prognose und anderer Therapie, wie der Multisystematrophie, der supranukleären Blickparese oder der kortikobasalen Degeneration, zu unterscheiden (Eller and Williams 2009). Es ist daher

nicht überraschend, dass auch erfahrene Neurologen unter Anwendung der gängigen diagnostischen Mittel in nur 91% der Fälle Patienten auch mit fortgeschrittenem IPS richtigerweise *ante mortem* erkennen können (Hughes et al. 2002). Die Erkenntnis aus pathologischen und bildgebenden Studien, dass der pathogene Prozess im Gehirn und damit der eigentliche Erkrankungsbeginn im Schnitt mindestens fünf Jahre vor der Manifestation motorischer Defizite anfängt (Fearnley and Lees 1991; Marek et al. 2001; Morrish et al. 1996), legt zudem ein gesteigertes Interesse in die Erkennung noch asymptomatischer Risikopatienten in dieser prämotorischen Krankheitsphase. Ein praktisches Beispiel ist die *Parkinson Associated At Risk Study (PARS)*, die durch einen einfachen Riechtest Personen mit Hyposmie, aber ohne Parkinsonsymptome, herausfiltert und weiteren bildgebenden Untersuchungen mittels SPECT zuführt (Morley and Hurtig 2010). Gerade auch im Hinblick auf die beginnende Entwicklung neuroprotektiver bzw. krankheitsmodifizierender Medikamente, die idealerweise in einer möglichst frühen Krankheitsphase gegeben werden sollten, um den neuronalen Zellverlust zu minimieren, sind Biomarker zur Krankheitsfrüherkennung dringend notwendig (Noelker et al. 2011). Zudem braucht es unabhängige und objektive Biomarker für die Krankheitsprogression in Therapiestudien, da gängige klinische Messmethoden, wie beispielsweise die *Unified Parkinson Disease Rating Scale (UPDRS)*, als primäre *Outcome*-Variablen den rein symptomatischen Benefit eines Medikaments von einem neuroprotektiven Effekt nicht differenziert darstellen können (Morley and Hurtig 2010). Ein Beispiel für die unzureichende Aussagekraft klinischer Messmethodik liefert die Diskussion, um den möglichen neuroprotektiven Effekt des Rasagilins in frühen Krankheitsstadien (Olanow et al. 2009). Auf Grund der Heterogenität des klinischen Befundes bei Krankheitsbeginn und im Krankheitsverlauf, der multiplen genetischen Ursachen und des zum Teil erheblichen interindividuellen Unterschieds im dopaminergen Zellverlust bei Beginn der motorischer Defizite sind wahrscheinlich eine Reihe von Biomarkern nötig, um das gesamte Spektrum der Klinik, Pathobiologie und Genetik beim IPS abzudecken (Noelker et al. 2011).

3.4.3 Stand der Forschung zu fluiden Biomarkern beim IPS

Aktuelle Studien zu Biomarkern für das IPS bzw. andere Synucleinopathien befassen sich vor allem mit Ergebnissen aus bildgebenden Verfahren (PET, SPECT und verschiedene MR-Methoden), mit Messungen krankheitsrelevanter Parameter in Körperflüssigkeiten (Blut und Liquor, Speichel) und der Etablierung differenzierter motorischer Messverfahren (Breen et al. 2011; Marek et al. 2008; Mollenhauer and Trenkwalder 2009). Im Folgenden wird ein Überblick über den Stand der Forschung zu potentiellen Biomarkern, die in Körperflüssigkeiten gemessen werden (fluide Biomarker), skizziert.

Die bisherige Suche nach Biomarkern konzentrierte sich auf einzelne Proteine, denen eine wichtige hypothetische Rolle in der Pathogenese des IPS zugesprochen wird. α -Synuclein ist, wie schon beschrieben, der wesentliche Bestandteil der Lewy-Körperchen und Mutationen im α -Synuclein Gen (SNCA) führen zu familiären Parkinsonformen. α -Synuclein ist daher ein potentieller Marker für den pathogenetischen Prozess bei Synucleinopathien. Vor kurzem konnte lösliches extrazelluläres α -Synuclein sowohl in neuronalen Zellkulturen, im humanen Liquor und Plasma nachgewiesen werden (El-Agnaf et al. 2003). Die Messung von α -Synuclein im Liquor führte bislang allerdings zu widersprüchlichen Ergebnissen. In drei Studien fanden sich reduzierte α -Synucleinkonzentrationen bei Patienten mit IPS im Vergleich zu gesunden Kontrollen (Hong et al. 2010; Mollenhauer et al. 2008; Tokuda et al. 2006). In der größten der drei Studien verglichen Hong et al. die totale α -Synucleinkonzentrationen von IPS-Patienten (n=80) mit gesunden Kontrollen (n=91; Sensitivität 93% und Spezifität 63%) und Alzheimer-Patienten (n=38; Sensitivität 93% und Spezifität 39%) mittels eines robusten Luminex Assays. Eine Korrelation zwischen der Schwere oder der Dauer der Erkrankung und der α -Synucleinkonzentrationen konnte dabei nicht gefunden werden (Hong et al. 2010). In zwei weiteren Studien ergab sich dagegen kein Unterschied in der α -Synucleinkonzentration im Liquor bei IPS-Patienten und Kontrollen (Borghi et al. 2000; Ohrfelt et al. 2009). Die Messung von α -Synuclein oder anderen Biomarkern im peripheren Blut stellt eine interessante Alternative dar. Humanes Plasma oder Serum ist wesentlich einfacher zu gewinnen als Liquor. Allerdings handelt es sich bei Plasma oder Serum um ein komplexeres Medium als Liquor – Liquor enthält nur 0,2% des Gesamteiweißgehalts des Blutes (Reiber 2006) – und dort gemessene Marker können theoretisch nur indirekt Auskunft über

zentralnervöse Prozesse geben. Die Messung von α -Synuclein im Plasma ergab daher auch inkonsistente Ergebnisse. So findet sich in Studien eine erhöhte Konzentration beim IPS (Duran et al. 2010; Lee et al. 2006), eine erniedrigte Konzentration beim IPS (Li et al. 2007b) oder kein Unterschied zwischen IPS und gesunden Kontrollen (Shi et al. 2010). Vielversprechender zeigen sich kürzlich vorgelegte Studien, die sich mit der Messung von oligomeren α -Synucleinformen befassten. Hierbei zeigten sich in Liquor und Plasma von IPS-Patienten erhöhte Konzentrationen von α -Synuclein Oligomeren im Vergleich zu Kontrollen (El-Agnaf et al. 2006; Tokuda et al. 2010). Die Ursachen für die Widersprüchlichkeit der geschilderten Ergebnisse liegen einerseits in der Verwendung unterschiedlicher Protokolle und Messverfahren (Western-Blot, Immunpräzipitation, ELISA, Luminex), in einer häufig geringen Fallzahl in den meisten Studien, sowie in der fehlenden Kontrolle möglicher Einflussgrößen (*confounder*) insbesondere im präanalytischen Umgang mit den verwendeten Proben. Hong et al. (2010) und Shi et al. (2010) waren die Ersten, die durch Messung des Hämoglobingehalts die Proben auf eine in-vitro Hämolyse roter Blutkörperchen während der Lumbalpunktion oder der Venenpunktion überprüften und korrigierten. Rote Blutkörperchen stellen mit 99% des gesamten α -Synucleins die Hauptquelle des Proteins im peripheren Blut (Barbour et al. 2008). Um dem Problem einer möglichen Blutkontamination zu entgehen, untersuchte eine Arbeitsgruppe Speichel von IPS-Patienten und gesunden Kontrollen auf α -Synuclein (Devic et al. 2011). Die Untersuchung von Speichelproben ist insofern interessant, da nachgewiesen werden konnte, dass die Glandula submandibularis in frühen Stadien des IPS eine Lewy-Körperchen-Pathologie aufweisen kann (Del Tredici et al. 2010). Trotz der kleinen Untersuchungszahl zeigte sich tendenziell eine Reduktion der α -Synucleinkonzentration bei IPS-Patienten.

Neben α -Synuclein wurden weitere potentiell krankheitsrelevante Proteine als Biomarker getestet. Das Antioxidans DJ-1, als Zeichen einer mitochondrialen Dysfunktion, wurde im Plasma von IPS-, Alzheimer-Patienten und Kontrollen mit ebenfalls sehr widersprüchlichen Ergebnissen untersucht (Maita et al. 2008; Shi et al. 2010; Waragai et al. 2006). Auch aus der Alzheimerforschung bekannte Marker wie A β 42 und Tau-Protein wurden insbesondere zur Erkennung von IPS-Patienten mit dem Risiko einer dementiellen Entwicklung herangezogen (Alves et al. 2010; Compta et al. 2009). Zwischen 60 und 80% der IPS-Patienten entwickeln im Laufe der Erkrankung eine Demenz (Buter et al. 2008; Hely et al. 2008). Dabei spielen sowohl eine Parkinson-typische wie Alzheimer-typische Pathologie in der Ätiologie der

Parkinsondemenz eine Rolle. Die Alzheimerpathologie ist mit Gedächtnisstörungen, die Lewy-Körperchen-Pathologie eher mit exekutiven Dysfunktionen und Störung der visuell-räumlichen Konstruktion assoziiert (Breen et al. 2011). A β ist im Liquor von IPS-Patienten im Vergleich zu gesunden Kontrollen reduziert und korreliert signifikant mit der Gedächtnisleistung der Patienten, aber nicht mit der exekutiven Dysfunktion (Alves et al. 2010). Die Tau-Protein-Konzentration war höher bei IPS-Patienten mit Demenz als bei IPS-Patienten ohne Demenz und gesunden Kontrollen (Compta et al. 2009). Im Bereich Parkinson-relevanter Autoantikörper erfolgte, wie schon beschrieben, die Untersuchung von natürlichen Autoantikörpern gegen α -Synuclein im Plasma. Während Papachroni et al. nur eine Korrelation der Autoantikörper mit einer familiären Parkinsonform fanden (Papachroni et al. 2007), zeigte eine neuere Untersuchung einen erhöhten Antikörpertiter bei IPS-Patienten im Vergleich zu gesunden Kontrollen (Yanamandra et al. 2011). Eine weitere Antikörperstudie untersuchte das Vorkommen von Anti-Neuromelanin Autoantikörpern bei Parkinsonpatienten (Double et al. 2009). Neuromelanin ist das charakteristische Pigment dopaminerger Zellen der SNpc und kann eine neuronale Entzündungsreaktion und einen Zellverlust auslösen, wenn es in SNpc von Ratten injiziert wird (Zecca et al. 2008). Darüber hinaus zeigte sich in *post-mortem* Studien, dass Neuromelanin im Gehirn von IPS-Patienten von aktivierter Mircoglia umgeben ist (Zucca et al. 2004). Dementsprechend fanden sich auch erhöhte Antikörpertiter als Zeichen einer adaptiven Entzündungsreaktion bei IPS-Patienten im Vergleich zu Kontrollen (Double et al. 2009).

Als eine neue Herangehensweise etabliert sich die Verwendung von High-Throughput-Systemen, mit denen ohne eine vorherige Priorisierung von potentiell krankheitsrelevanten Proteinen eine große Anzahl von niedermolekularen Komponenten aus Gewebeproben (z.B. Plasma) untersucht werden kann (Breen et al. 2011). Ein so gewonnener Biomarker kann aus einem einzigen Molekül oder aus einem Muster aus mehreren Molekülen bestehen. Beispielsweise wurden in einer sogenannten *metabolic profiling*-Studie Plasmaproben von unmedizierten IPS-Patienten und gesunden Kontrollen anhand der Konzentration von ca. 2000 Variablen verglichen. Eine signifikante Veränderung fand sich hier bei zwei Antioxidantien (Glutathion und Harnsäure) (Bogdanov et al. 2008). Ebenso finden Proteomstudien zunehmend Verwendung in der Suche nach neuen Biomarkern. So fand eine Studie in Liquor acht potentielle Biomarker inklusive schon bekannte Kandidaten, wie das Tau-Protein und das A β 42 (Zhang et al. 2008).

Zusammenfassend bleibt festzustellen, dass sich trotz intensiver Forschung in den letzten zwei Dekaden bei der Untersuchung von Blut und Liquor bislang kein Biomarker mit einer ausreichenden Sensitivität und Spezifität etablieren konnte, um in der klinischen Praxis eine routinemäßige Anwendung zu finden (Eller and Williams 2009). Nur wenige Biomarker haben einen wissenschaftlichen Evidenzgrad erreicht, um sich als mögliche Kandidaten im klinischen Alltag zu etablieren. Die meisten Publikationen basieren auf einzelnen Fallstudien, denen häufig eine ausreichende analytische und klinische Validierung, insbesondere eine nachgewiesene Reproduzierbarkeit fehlt (Noelker et al. 2011).

3.5 Ziel der Arbeit

Vor dem Hintergrund der hier skizzierten Forschungsergebnisse lassen sich folgende Feststellungen ableiten:

- Es gibt eine hinreichende Evidenz, dass dem α -Synuclein Protein eine zentrale Bedeutung in der Pathogenese des IPS zukommt.
- Mit der Entdeckung natürlich vorkommender Autoantikörper gegen α -Synuclein im Blut von IPS-Patienten und gesunden Probanden eröffnet sich möglicherweise ein bisher unerforschter wichtiger Teilaspekt der Erkrankung.
- In Anbetracht der Tatsache, dass ein geeigneter Biomarker für das IPS weiterhin nicht zur Verfügung steht, ist eine Evaluierung potentieller neuer Marker unbedingt lohnenswert.

Die konsequente Fragestellung aus diesen Überlegungen ist die Evaluierung des natürlich vorkommenden Autoantikörpers gegen α -Synuclein in seiner Wertigkeit als potentiellen Biomarker für das IPS vor dem Hintergrund seiner möglichen physiologischen Bedeutung in der neuronalen α -Synuclein-Prozessierung. Das Ziel der vorliegenden Arbeit war demnach zunächst die Etablierung und Validierung eines geeigneten Messverfahrens zur möglichst quantitativen Bestimmung des natürlich vorkommenden Autoantikörpers gegen α -Synuclein im humanen Serum und Liquor. Im Anschluss erfolgte die Messung des Autoantikörpers bei Patienten mit IPS und gesunden Kontrollprobanden, sowie zur weiteren diagnostischen Spezifizierung bei Patienten mit Alzheimer Demenz. Neben dem Vergleich zwischen den diagnostischen Gruppen wurde der gemessene Autoantikörper innerhalb der Parkinsongruppe bezüglich des Alters der Patienten, der Schwere und der Dauer der Erkrankung

untersucht. Darüber hinaus erfolgte zusätzlich die Bestimmung des α -Synucleingehalts im Serum zum Vergleich der untersuchten diagnostischen Gruppen und zur Beurteilung einer potentiellen wechselseitigen Beeinflussung zwischen Protein und Autoantikörper.

Die Arbeit folgt dabei dem klassischen Aufbau: Material und Methodik, Vorstellung der Ergebnisse und Diskussion. Der Methodenteil wurde zu Gunsten der Ergebnisse bewusst kurz gehalten, da ein erheblicher Anteil der Arbeit in der Methodenetablierung und -validierung bestand, die im Ergebnisteil wiedergegeben werden. Zum besseren Verständnis der Etablierung wurden in den jeweiligen Kapiteln kurze methodologische Einführungen gegeben. Der Ergebnisteil teilt sich daher in die Methodenetablierung und in die praktische Anwendung der Methodik im Rahmen der wissenschaftlichen Fragestellung auf.

4 MATERIAL

4.1 Geräte

Biotrak II Platewasher	Amersham Bioscience, Piscataway, NJ, USA
Einkanalpipetten Eppendorf Research 20µl, 100µl, 1000µl	Eppendorf AG, Hamburg
Elektronische Analysewaage ME-235S-OCE	Sartorius AG, Göttingen
Elektrophoresekammer XCell Sure Lock	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
Elektrophorese Power-supply Power Pac 3000	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Entwicklermaschine Optimax Typ TR	MS-L GmbH, Wiesloch
Handdispenser Multipette plus	Eppendorf AG, Hamburg
Kreisschüttler MS 1 Minishaker	IKA Werke GmbH & CO. KG, Staufen
Magnetrührer MR hei-tec	Heidolph GmbH & Co KG, Schwabach
Multikanalpipette Eppendorf Research 300µl	Eppendorf AG, Hamburg
Multiskan Ex Microplate Reader	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
pH-Meter MP 220	Mettler-Toledo GmbH, Gießen
Pipettierhilfe Accu-jet pro	Brand GmbH & Co KG, Wertheim
Reagenzglasschüttler VWR 444-1372	VWR International GmbH, Darmstadt
Rotator 360° PTR-60	Grant Instruments (Cambridge) Ltd, Cambridgeshire, Großbritannien
Schüttelgerät Unimax 1010	Heidolph GmbH & Co KG, Schwabach
UV-Vis-Spektralphotometer NanoDrop ND 1000	PEQLAB Biotechnologie GMBH, Erlangen
Tankblot Modul XCell II Blot Module	Invitrogen GmbH, Karlsruhe

Thermomixer HLC MKR13	HLC BioTech, Bovenden
Tischzentrifuge Eppendorf 5451 D	Eppendorf AG, Hamburg
Vakuumpumpe KNF Lab Laboport	KNF NEUBERGER, INC., Trenton, USA
Wasserbad	P-D Industriegesellschaft mbH, Dresden
Zentrifuge Biofuge Stratos	Heraeus Holding GmbH, Hanau
Zentrifuge Megafuge 1.0 R	Heraeus Holding GmbH, Hanau

4.2 Verbrauchsmaterialien

AminoLink* Plus Coupling Resin and Immobilization Kit	Thermo Fischer Scientific, Rockford, USA
BD Falcon Round-Bottom Probenröhrchen 5ml	Becton Dickinson GmbH, Heidelberg
Combitips plus 10ml	Eppendorf AG, Hamburg
Einmalhandschuhe NOBAGLOVE-Latex 240 mm, puderfrei	NOBA Verbandmittel Danz GmbH&CoKG, Wetter
Einmalinjektionskanülen Sterican 0,9 x 40mm; 20 G x 1 ½"	Braun AG, Melsungen
Einmalspritzen NORM-JECT 1ml	Henke Sass Wolf GmbH, Tuttlingen
Einmalspritzen Omnifix 10ml	Braun AG, Melsungen
ELISA-Platte 96 Well F-Boden Maxisorp	Nunc, Roskilde, Denmark
ELISA-Platte 96 Well U-Boden high bind	Iwaki brand Scitech Div., Iwaki, Japan
Filter Minisart RC 4 0,2µm	Sartorius Stedim Biotech GmbH, Göttingen
Filterpapier	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Kunststoffreagenzröhre 15ml, 50ml	Sarstedt AG & Co, Nümbrecht
Microplatte 96 Well F-Boden Microlon High Bind	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen

Microplatte 96 Well F-Boden Microlon Medium Bind	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen
Microplatte 96 Well U-Boden Microlon High Bind	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen
Mikroporöse Fritte	Thermo Fischer Scientific, Rockford, USA
NuPAGE 12 % BisTrisGel 1mm (10 Taschen)	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
Parafilm „M“	Pechiney Plastic Packaging, Chicago, USA
pH 1-10 Universalindikator Papier	Merck KGaA, Darmstadt
Pipettenspitzen	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen
Protein LoBind Tube (0,5/1,5/2ml)	Eppendorf AG, Hamburg
Reagenzreservoirs 60ml PP	Brand GmbH, Wertheim
Reagiergefäße (0,5/1,5/2ml)	Sarstedt AG & Co, Nümbrecht
Roti-PVDF-Membran T830.1	Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe
S-Monovette 9ml Z-Gel	Sarstedt AG & Co, Nümbrecht
SealPLate, Sealing Films, Non-Sterile	EXCEL Scientific Inc., Victorville, CA, USA
Serologische Pipetten (5-30ml)	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen
Sterilfiltrationsaufsätze Filtropur BT50 500ml, 0,2µm	Sarstedt AG & Co, Nümbrecht
VivaSpin2 5,000 MWCO PES	Sartorius Stedim Biotech GmbH, Göttingen
VivaSpin6 10,000 MWCO PES	Sartorius Stedim Biotech GmbH, Göttingen

4.3 Chemikalien

Alkaline Phosphatase Blue Microwell Substrate	Sigma-Aldrich Co, St. Louis, MO, USA
AminoLink Plus Coupling Resin Gel	Thermo Fischer Scientific, Rockford, USA

Anti-human IgG antibody POD-markiert	Calbiochem, San Diego, CA, USA
Anti-mouse IgG antibody HRP-markiert	Thermo Fischer Scientific, Rockford, USA
Anti-rabbit IgG antibody AP-markiert	Millipore, Billerica, MA, USA
Antioxidant	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
Bovines Serum Albumin (BSA) A9647	Sigma-Aldrich Co, St. Louis, MO, USA
CL-Xposure Film Clear blue X-Ray Film	Thermo Fischer Scientific, Rockford, USA
Dinatriumhydrogenphosphat (Na_2HPO_4)	Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe
FL 140 rabbit anti-human α -Synuclein antibody	Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA
Glycin ($\text{C}_2\text{H}_5\text{NO}_2$)	Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe
Humanes Serum Albumin (HSA) Fraktion V	Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg
Kaliumchlorid (KCl)	Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe
Kaliumdihydrogenphosphat (KH_2PO_4)	Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe
MCA 2A7 Antikörper	EnCor Biotechnology Inc., Gainesville, FL, USA
Methanol 100%	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Mouse (monoclonal) anti-human α -Synuclein antibody clon 211	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
Natriumazid (NaN_3)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Natriumbicarbonat (NaH_2CO_3)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Natriumcarbonat (Na_2CO_3)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Natriumchlorid (NaCl)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Natriumcyanoborhydrid (NaCNBH_3)	Thermo Fischer Scientific, Rockford, USA

Natriumhydrogenphosphat (NaH_2PO_4)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Natriumhydroxid (NaOH)	Merck KGaA, Darmstadt
Normal Goat Serum IHC Antibody	Bethyl Laboratories, Montgomery, TX, USA
NuPAGE LDS Sample Buffer (4x)	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
NuPAGE MES SDS Running Buffer (20x)	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
NuPAGE Transfer Buffer (20x)	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
Octagam Intravenöse Immunglobuline (IVIg)	Octapharma Produktionsgesellschaft, Lachen, Schweiz
Proteingrößenmarker SEE Blue Plus 2 Prestained Standard	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
Roti®-Block	Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe
Salzsäure (HCl) 37%	Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe
Schwefelsäure (H_2SO_4) 99,9%	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
SuperSignal West Dura Substrat	Thermo Fischer Scientific, Rockford, USA
TMB soluble	Calbiochem, Merck Chemicals Ltd., Nottingham, UK
TRIS	Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe
Triton X100	Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe
Tween20	AppliChem GmbH, Darmstadt
α -Synuclein, human rekombinant	rPeptide, Bogart, USA

4.4 Lösungen und Puffer

Wasser:

Es wurde ausschließlich steriles, zweifach destilliertes Wasser verwendet: Ampuwa (Fresenius Kabi GmbH, Bad Homburg).

Allgemeine Puffer und Lösungen:

10x PBS (engl. *phosphate buffered saline*):

80g NaCl, 2g KCl, 26,8 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 - 7\text{H}_2\text{O}$ und 2,4g KH_2PO_4 wurden in einem 1L Reagenzzylinder in 800ml Ampuwa gelöst. Der pH-Wert wurde mit 37%iger HCl Lösung auf 7,4 titriert. Anschließend wurde der Zylinder auf 1L Gesamtvolumen aufgefüllt und der Puffer steril filtriert. Die Lagerung erfolgte bei Raumtemperatur.

1x PBS:

100ml des 10x PBS wurden in einem 1L Messzylinder mit 900ml Ampuwa einfach verdünnt und steril filtriert.

Affinitätschromatographie:

Kopplungspuffer:

0,1M Natriumphosphatpuffer, 0,15M NaCl, pH 7,2:

- 0,2M NaH_2PO_4 : 23,9g NaH_2PO_4 wurden in 500ml Ampuwa im Messzylinder gelöst. Im Anschluss wurde der Messzylinder auf 1L aufgefüllt.
- 0,2M Na_2HPO_4 : 28,4g Na_2HPO_4 wurden in 500ml Ampuwa im Messzylinder gelöst. Im Anschluss wurde der Messzylinder auf 1L aufgefüllt.

Um den pH-Wert 7,2 zu erreichen, wurden 28ml 0,2M NaH_2PO_4 und 72ml 0,2M Na_2HPO_4 vermischt. Zum Abschluss wurden 1,75g NaCl hinzugeben und die Lösung auf 200ml aufgefüllt.

Sättigungspuffer/TRIS Puffer:

1M TRIS, pH 7,4:

121,14g tris(hydroxymethyl)-aminomethan ($\text{C}_4\text{H}_{11}\text{NO}_3$) wurden in 800ml Ampuwa gelöst. Der pH-Wert wurde mit 37%iger HCl Lösung auf 7,4 angeglichen. Im Anschluss wurde Ampuwa bis zu einem Gesamtvolumen von 1L hinzugegeben.

Säulen Waschlösung:

1M NaCl:

58,44g NaCl wurden in 800ml Ampuwa gelöst. Nachdem das Salz in Lösung gegangen war, wurde der Zylinder mit Ampuwa bis zu einem Gesamtvolumen von 1L aufgefüllt.

Zyanoborohydrid Lösung:

5M NaCNBH₃ in 1M NaOH:

4g NaOH wurden in 100ml Ampuwa gelöst, um eine Konzentration von 1M NaOH zu erreichen. 80mg NaCNBH₃ wurden in 0,25ml 1M NaOH glöst.

Glycinpuffer:

100mM Glycin (C₂H₅NO₂), pH 2,8:

1,5g Glycin wurde in 200ml Ampuwa gelöst und der pH-Wert mit 37%iger HCl Lösung auf 2,8 eingestellt. Der Puffer wurde anschließend steril filtriert, aliquotiert und bei -20°C bis zum Gebrauch eingefroren.

1% Natriumazid-Lösung:

1g NaN₃ wurde in 100ml Ampuwa gelöst.

Western-Blot:

Hierfür wurden rein kommerziell erhältliche Fertigpuffer verwendet (siehe Auflistung Chemikalien). Etwaige Verdünnungen der Fertiglösungen erfolgten nach Angaben der Hersteller.

ELISA:

Beschichtungspuffer α-Synuclein Autoantikörper Serum ELISA:

Phosphatpuffer: 1,7mM NaH₂PO₄, 98mM Na₂HPO₄, 0,05% NaN₃, pH 7,4:

265mg NaH₂PO₄, 13,9g Na₂HPO₄ und 0,5g NaN₃ wurden in einem 1L Messzylinder in 800ml Ampuwa gelöst. Der pH-Wert wurde mit 37%iger HCl Lösung auf 7,6 eingestellt.

Anschließend wurde der Messzylinder auf ein Gesamtvolumen von 1L mit Ampuwa befüllt. Der Puffer wurde steril filtriert und bei 4°C gelagert.

Beschichtungspuffer α -Synuclein Serum ELISA:

Carbonatpuffer: 15mM Na₂CO₃, 35mM NaH₂CO₃:

1,59g Na₂CO₃ und 2,93g NaH₂CO₃ wurden in 800ml Ampuwa in einem 1L Messzylinder gelöst. Mittels der 37%iger HCl Lösung wird der pH-Wert auf 9,6 eingestellt und durch Zugabe von Ampuwa der Messzylinder auf ein Gesamtvolumen von 1L befüllt. Der Puffer wurde steril filtriert und bei 4°C gelagert.

Blockierungspuffer α -Synuclein Autoantikörper Serum ELISA:

1x PBS mit BSA 5%:

5g BSA wurden in einem Becherglas abgewogen und in 100ml 1x PBS unter leichtem Rühren für etwa 20min bei Raumtemperatur gelöst.

Blockierungspuffer α -Synuclein Serum ELISA:

1x PBS mit BSA 5% und Tween20 1%:

5% BSA Lösung wurde, wie oben beschrieben, in der benötigten Menge angesetzt und mit Tween20 zu einer Endkonzentration von 1% (vol/vol%) versetzt.

Verdünnungspuffer α -Synuclein Autoantikörper Serum ELISA:

1x PBS mit BSA 5% und Tween20 0,1%:

5% BSA Lösung wurde, wie oben beschrieben, in der benötigten Menge angesetzt und mit Tween20 zu einer Endkonzentration von 0,1% (vol/vol%) versetzt.

Waschlösung für beide ELISA:

1x PBS mit Tween20 0,05%:

200ml des 10x PBS wurden mit 1800ml Ampuwa verdünnt. Nach steriler Filtration in ein 2L Glasgefäß folgte die Zugabe von 1ml Tween20.

Stopplösung α -Synuclein Antikörper Serum ELISA:

2N Schwefelsäure (H₂SO₄):

5ml konzentrierte H₂SO₄ wurden mit 95ml Ampuwa verdünnt.

5 METHODEN

5.1 Affinitätschromatographie

5.1.1 Theoretischer Hintergrund

Bei der Affinitätschromatographie handelt es sich um ein hoch spezifisches und selektives Trennverfahren zur Isolation eines Analyten aus einer komplexen Mischung verschiedener Stoffe. Das Prinzip der hier angewendeten Antigen-Affinitätschromatographie beruhte auf einer spezifischen und reversiblen Bindung eines Antikörpers an einen Antigenliganden, der zuvor mittels chemischer Kopplung an einer Gel-Matrix als feste Phase kovalent gebunden wurde. Als Antigenligand fungierte rekombinant hergestelltes α -Synuclein. Die aktivierte Gel-Matrix bestand aus 4%iger quervernetzter Agarose und besaß Aldehyde als funktionelle Gruppen, die spontan mit primären Aminen des Antigenliganden zu Schiff-Basen reagieren konnten. Die Schiff-Base wurde durch Zugabe von Natriumzyanoborohydrid zu einer stabilen sekundären Aminbindung reduziert. Die Durchführung der Affinitätschromatographie erfolgte dann in mehreren Schritten. Nachdem eine Lösung mit dem adsorbierenden Analyten (hier der Autoantikörper gegen α -Synuclein) auf die Gel-Matrix gegeben worden war, wurden überschüssige Bestandteile der Lösung aus der Matrix gewaschen. Der adsorbierte Antikörper wurde anschließend durch einen Konformationswechsel auf Grund einer Änderung des pH-Wertes ins saure Milieu aus der Gel-Matrix eluiert und gesammelt (Lottspeich and Engels 2006).

Ziel der Affinitätschromatographie war die Aufreinigung des natürlich vorkommenden Autoantikörpers gegen α -Synuclein aus einem humanen Immunglobulinkonzentrat (IVIg = intravenöse Immunglobuline). Der affinitätsgereinigte IVIg Autoantikörper wurde als Standard- und als Referenzprobe bei der ELISA Etablierung und bei der späteren Probenmessung verwendet. IVIg besteht vornehmlich aus Immunglobulinen der Klasse G, die aus dem Plasma mehrerer tausend Spender gewonnen werden. Immunglobulinkonzentrate werden in der Medizin bei primärem oder sekundärem Antikörpermangel oder einer Reihe immunologisch vermittelter Erkrankungen wie der Multiplen Sklerose therapeutisch eingesetzt (Dodel et al. 2010; Lutz et al. 2009).

5.1.2 Aufbau

Alle verwendeten Materialien für den Bau der Affinitätschromatographiesäule wurden auf Raumtemperatur gebracht.

1mg rekombinant hergestelltes α -Synuclein wurde in 2ml Ampuwa gelöst und anschließend in eine VivaSpin2 Säule überführt. Die VivaSpin2 Säule wurde drei Mal mit 12000 x g für 5min zentrifugiert und nach jedem Zentrifugationsschritt mit Kopplungspuffer aufgefüllt. So erfolgte die Umpufferung des gelösten α -Synucleins in 2ml Kopplungspuffer.

Die Polypropylensäule wurde aufrecht durch einen Einschnitt in den Deckel einer 50ml Kunststoffreagenzröhre in einen Laborständer platziert. Nach Verschluss der unteren Öffnung wurde die Säule mit 1M NaCl Waschlösung aufgefüllt. Eine Porusfritte wurde von oben nach unten bis zum Konus der Säule gedrückt. Die Waschlösung wurde abgeschüttet und die leere Säule mit 4ml AminoLink Plus Coupling Resin (50% halbfüssiges Gel) gefüllt, um eine 2ml Gel-Matrix zu erhalten. Nachdem sich das Gel nach 30min gesetzt hatte, wurde eine zweite Porusfritte oben in die Säule gesetzt und langsam nach unten gedrückt bis sie sich 1-2mm oberhalb des Gels befand. Die Matrix durfte dabei nicht komprimiert werden. Die Säule wurde erneut mit Waschpuffer gefüllt um übrig gebliebenes Gel oberhalb der oberen Porusfritte zu entfernen. Der untere Verschluss wurde dabei geöffnet, um die Waschlösung austropfen zu lassen. Anschließend wurde die Gel-Matrix durch Zugabe von 6ml Kopplungspuffers auf pH 7,2 äquilibriert. Nach Verschluss der unteren Öffnung konnte das in Kopplungspuffer gelöste α -Synuclein auf die Säule gegeben werden. Unter der Abzugshaube wurden 40 μ l einer frisch angesetzten 5M NaCNBH₃ Lösung hinzupipettiert. Durch Entfernen der unteren Verschlusskappe konnte die Proteinlösung in das Gel sinken. Die Säule wurde oben und unten sicher verschlossen und bei 4°C über Nacht über Kopf geschüttelt. Am nächsten Tag tropfte die Säule nach Entfernung des unteren Verschlusses aus und die Matrix wurde mit 4ml Kopplungspuffer gewaschen. Anschließend mussten die übrig geblieben aktiven Aldehydgruppen der Matrix mit TRIS blockiert werden. Hierzu wurde die Säule mit 4ml Sättigungspuffer gewaschen. Anschließend ließ man weitere 4ml Sättigungspuffer zusammen mit 40 μ l 5M NaCNBH₃ Lösung in das Gel einsinken, verschloss die Säule oben und unten und ließ sie für 30min bei Raumtemperatur über Kopf schütteln. Die Säule wurde danach mit 10ml Waschlösung gewaschen. Zur langfristigen Aufbewahrung wurde das Gel mit PBS

unter Zusatz von 0,05% Natriumazid auf einen neutralen pH-Wert äquilibriert. Die Lagerung der Säule bis zum Gebrauch erfolgte bei 4°C.

5.1.3 Arbeitsablauf: Aufreinigung und Elution

Vor einem Durchlauf wurde die Säule mit 50ml PBS gewaschen. Die IVIg Lösung wurde vor dem Auftragen auf das Gel 1:2 mit PBS zu einem Gesamtvolumen von 20ml verdünnt. Von der verdünnten Lösung ließ man 3,5ml in das Gelbett der Säule einlaufen bis ein kleiner Überstand übrig blieb. Die Säule wurde oben und unten verschlossen und für eine Stunde bei Raumtemperatur stehen gelassen. Anschließend ließ man die Säule austropfen und gab erneut 3,5ml der IVIg Lösung auf das Gel. Der Schritt wurde wiederholt, bis die IVIg Lösung aufgebraucht war. Vor Elution wurde die Säule nochmals mit 30ml PBS gewaschen, um ungebundene IVIg Bestandteile aus dem Gel zu entfernen. In der Zwischenzeit wurde Glycinpuffer pH 2,8 von -20°C im Warmwasserbad auf Raumtemperatur gebracht. Nach Austropfen des PBS aus der Säule wurden 8ml Glycinpuffer auf die Gelmatrix gegeben und das sofort austropfende Eluat in 16 vorbereitete 1,5ml Reagiergefäße zu je 0,5ml aufgefangen. Nach der Elution wurde die Säule mit 50ml PBS gewaschen, um das Gel wieder auf einen neutralen pH-Wert zu puffern.

Die aufgefangenen 16 Fraktionen des Eluats wurden durch Zugabe von 5 bis 30µl 1M TRIS Puffer und unter Kontrolle mit pH-Meter-Papier auf neutrale pH-Werte gebracht. Anschließend wurden alle Fraktionen zur Lagerung mit 25µl 1% Natriumazid versetzt.

Die Konzentration der eluierten Autoantikörper in den einzelnen Fraktionen wurde mit Hilfe eines UV-Vis-Spektralphotometers (NanoDrop ND 1000) bestimmt. Hierbei wurde ein Volumen von 1µl auf die optische Messfläche des Gerätes gegeben. Die Konzentrationsbestimmung erfolgte über die Messung der Absorption bei 280nm und einer molekulargewichtsadaptierten Berechnung der NanoDrop-Software. Abb. 3 zeigt exemplarisch die Konzentrationsverteilung in den einzelnen 16 Fraktionen eines Säulendurchlaufs. Von den Fraktionen wurden nur jene aufgehoben, die ein spezifisches Konzentrationsmaximum (mittlere Fraktionen) aufwiesen. Die Lagerung erfolgte bei 4°C.

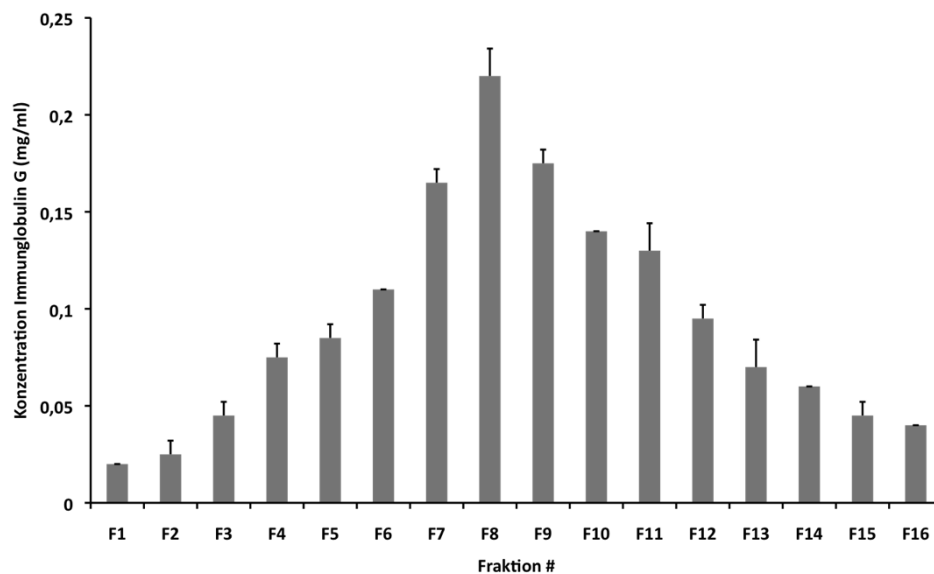


Abb. 3: Affinitätschromatographie. Exemplarische Darstellung der Autoantikörperkonzentrationsverteilung in 16 konsekutiv aufgefangenen Fraktionen eines Säulendurchlaufs. Durch Änderung des pH-Werts der Gel-Matrix ins saure Milieu kam es zu einer Konformationsänderung der adsorbierten Antikörper. Diese lösten sich aus der Matrix und konnten ausgewaschen werden. Nach Abtropfen des noch verbliebenen PBS Puffers in der Gel-Matrix (Fraktionen 1-6) folgte ab den mittleren Fraktionen ein spezifischer Anstieg der Immunglobulinkonzentration (Fraktionen 7-11). Nur diese mittleren Fraktionen wurden zur weiteren Aufkonzentrierung des Antikörpers aufbewahrt. Mittelwerte ($n=2$) \pm Standardabweichung.

5.1.4 Aufkonzentrierung des eluierten Autoantikörpers

Eine VivaSpin 6 Säule wurde mit 6ml PBS befüllt und mit 8000 x g für 10min bei 4°C zentrifugiert. Anschließend wurde der Durchlauf verworfen und die Säule mit den aufgehobenen Fraktionen der Autoantikörperelution aufgefüllt. Es erfolgte eine erneute Zentrifugation bei 6000 x g für 15min bei 4°C bis zu einem Überstand von 1-2ml. Der eluierte Antikörper wurde in PBS umgepuffert, indem die VivaSpin Säule mit PBS aufgefüllt und bei obig beschriebenen Konditionen erneut zentrifugiert wurde. Dieser Schritt wurde drei Mal wiederholt. Bei der letzten Zentrifugation wurde die Antikörperkonzentration des Überstands mit Hilfe des NanoDrop Geräts bestimmt. Gegebenenfalls musste der Überstand für 1-2min durch Zentrifugation weiter aufkonzentriert werden, um eine Probenkonzentration von größer 2mg/ml zu erreichen. Der affinitätsgereinigte und aufkonzentrierte IVIg Autoantikörper wurde anschließend aliquotiert und bei -20°C bis zum Gebrauch eingefroren.

5.2 Western-Blot

5.2.1 Theoretischer Hintergrund

Die Western-Blot Methode ermöglicht die Identifizierung und Quantifizierung spezifischer Proteine innerhalb eines Proteingemisches. Dabei wird das Proteingemisch nach Vorbereitung unter nativen oder denaturierten Bedingungen vor der eigentlichen Detektion mittels Gelelektrophorese aufgetrennt. In dieser Arbeit wurde eine SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese verwendet (NuPAGE® Invitrogen), bei der die Proteine im elektrischen Feld einzig nach ihrer Molekularmasse aufgetrennt werden (Laemmli 1970). SDS (engl. *sodium dodecyl sulfate*) oder LDS (engl. *lithium doecyl sulfate*) sind anionische Detergenzien, die hydrophobe Wechselwirkungen innerhalb der Proteine auflösen. Höhere Proteinstrukturen (Quartär-, Tertiär- und Sekundärstrukturen) gehen damit verloren und das Protein liegt linear in seiner Primärstruktur vor. Durch seine stark negative Ladung überdeckt SDS/LDS zudem die Eigenladung der Proteine. Es entstehen SDS/LDS-Proteinkomplexe mit einem konstanten Verhältnis von Ladung und Masse. Die Auftrennung der Proteine im elektrischen Feld erfolgt daher nur in Abhängigkeit ihrer Molekularmasse. Die Proteine wandern in einem diskontinuierlich gegossenen Polyacrylamidgel. Zunächst wird der Probenansatz im Sammelgel (4% Acrylamid) fokussiert, um im anschließendem Trenngel nach Gewicht zu wandern. Nach Auftrennung erfolgt der Transfer der Proteine aus dem Polyacrylamidgel auf eine Polyvinylidendifluorid (PVDF) Membran, dem eigentlichen *Blotten* (Towbin et al. 1979). Im Wet-Blot-Verfahren werden die Proteine durch Anlegen einer Spannung zwischen zwei Scheiben-Elektroden elektrophoretisch zur Anode transferiert. Die Detektion der membran-fixierten Proteine erfolgt gewöhnlich mit spezifischen Antikörpern (Primärantikörper), die in einem zweiten Schritt von einem speziesspezifischen Enzym-markierten Sekundärantikörper gebunden werden. Man spricht daher auch von Immunoblot. Durch Zugabe eines geeigneten Enzymsubstrats, das ein nachweisbares Signal produziert, können die detektierten Proteine sichtbar gemacht werden (Lottspeich and Engels 2006; Luttmann et al. 2009).

In der vorliegenden Arbeit wurde die Bindungsspezifität des affinitätsgereinigten IVIg Antikörpers vor seiner Verwendung im ELISA an rekombinant hergestelltes α -Synuclein mittels Western-Blot untersucht.

5.2.2 Proteinvorbereitung

Rekombinat hergestelltes α -Synuclein (lyophilisiert 1mg) wurde in 500 μ l Ampuwa gelöst (= 2mg/ml). Das gelöste Peptid wurde anschließend über einen Minisart-Filter in ein Low-bind Reagiergefäß übertragen, zu je 20 μ l aliquotiert und bei -20°C bis zum Gebrauch für Western Blot und ELISA aufbewahrt.

Kurz vor der Verwendung wurde das gelöste α -Synuclein auf Eis langsam aufgetaut. Aus der Lösung wurde das entsprechende Volumen entnommen, um einem Probenansatz von 5, 2,5 und 1 μ g α -Synuclein zu erhalten. Der Probenansatz wurde mit 4x LDS Puffer mit DTT vermischt und im Schüttelinkubator bei 95°C für 5min denaturiert. Anschließend mit 1500 x g für 5min zentrifugiert und auf Eis gelagert.

5.2.3 Durchführung der Gelelektrophorese

Eine NuPAGE® Bis-Tris 12% 1mm Fertiggelkassette wurde nach Entfernen des Taschenkamms in eine Invitrogen-Gelkammer für Gelelektrophorese gespannt und die Innenkammer mit MES Laufpuffer gefüllt. Die Probenansätze und 2 μ l Größenmarker für Western Blot wurden in die Geldaschen pipettiert. Die Außenkammer wurde mit dem restlichen Laufpuffer gefüllt, die gesamte Kammer mit Deckel verschlossen und die Elektrophorese bei 160V für etwa 40min laufen gelassen.

5.2.4 Blotten und Proteindetektion

Das Blotten erfolgte nach dem *Tankblot*-Verfahren (auch *Wet-Blot* genannt). Nach Beendigung der Gelelektrophorese wurde der Laufpuffer aus der Kammer abgegossen und das Gel vorsichtig aus der Gelkassette entnommen. Parallel wurde die PVDF Membran in 100% Methanol kurz aktiviert und anschließend in Transferpuffer äquilibriert. Ebenfalls wurden zur Größe der Membran passend geschnittene Filterpapierstücke und Schaumstoffschwämme in Transferpuffer gelegt. Das Unterteil (spätere Kathode) der speziellen *Tankblot*-Vorrichtung wurde auf den Tisch gelegt und nachfolgend im *Sandwich*verfahren beschichtet:

- Zwei gut getränkte Schaumstoffschwämme
- Ein Filterpapier
- Das entnommene Gel mit dem aufgetrennten α -Synuclein
- Aktivierte PVDF Membran
- Ein Filterpapier
- Zwei gut getränkte Schaumstoffschwämme

Anschließend wurde die *Tankblot*-Kassette mit dem Oberteil (spätere Anode) verschlossen, in die entsprechende Vorrichtung eingespannt, inner- und außerhalb mit Transferpuffer aufgefüllt und die Proteine bei ca. 20V für 45min mit einer Stromstärke von etwa 160mA geblottet, d.h. aus dem Gel auf die Membran übertragen.

Nach Beendigung des Blot-Vorgangs wurde die Membran aus dem *Tankblot* in eine Plastischale überführt und überschüssige Bindungsstellen für 2h bei RT mit 1x Roti[®]-Block blockiert. Die Detektion des α -Synucleins erfolgte mit dem monoklonalen murinen Antikörperklon Syn211 (mAb211) oder dem affinitätsgereinigten IVIg Autoantikörper je 1:20000 in Roti[®]-Block als 1. Antikörper über Nacht bei 4°C. Am nächsten Tag wurde die Membran mit PBS + Tween20 0,05% vier Mal je 10min gewaschen und anschließend mit dem passenden 2. Antikörper (goat anti-mouse oder goat anti-human je mit Merrettichperoxidase gekoppelt 1:100000 in PBS + Tween20 0,05%) für 1h bei RT inkubiert. Nach Ablauf der Zeit wurde die Membran erneut vier Mal gewaschen. Die Filmentwicklung erfolgte mit *SuperSignal West Dura* von Pierce – ein nach enzymatischen Umsatz chemolumineszierenden Substrat. Hierzu wurden Flüssigkeit A und B (1ml und 1ml) gemischt und die Membran damit für 5min inkubiert. Die Membran wurde anschließend in Filterpapier unter sanftem Druck getrocknet und in eine Röntgenkassette überführt. Unter Rotlicht erfolgte die mehrmalige Filmbelichtung in der Röntgenkassette für 10s bis 5min und die weitere Filmentwicklung mittels Entwicklermaschine. Die fertigen Filme wurden zu digitalen Weiterbearbeitung eingescannt.

5.3 ELISA

5.3.1 Theoretischer Hintergrund

Der *Enzyme-linked ImmunoSorbent Assay* (ELISA) ist ein weit verbreitetes immunologisches Verfahren zum qualitativen oder quantitativen Nachweis von

Antikörpern oder Antigen in biologischen Probenflüssigkeiten wie beispielsweise Serum, Plasma, Liquor, Gewebe- oder Zelllysaten. Die Methode wurde erstmals in den frühen 1970er-Jahren von zwei Gruppen parallel beschrieben (Avrameas and Guilbert 1971; Engvall and Perlmann 1971; Engvall and Perlmann 1972) und hat sich seitdem kontinuierlich weiterentwickelt (Crowther 1995; Crowther 2001; Kemeny and Challacombe 1988). Das Prinzip des ELISAs beruht auf dem Entstehen mindestens einer spezifischen Antigen-Antikörper-Bindung, wobei einer der beiden Bindungskomponenten an einer festen Phase gebunden sein muss. Als feste Phase dienen hierbei speziell entwickelte Microtiterplatten auf deren Kunststoffoberfläche aus Polystyren Biomoleküle durch Van-Waals-Wechselwirkungen gebunden werden. Bei den meisten Proteinen erfolgt die Adsorption an die Plastikoberfläche durch hydrophobische Wechselwirkungen unpolarer Substrukturen des Proteins mit der Plastikmatrix. Bei Peptiden mit einem hohen Anteil an hydrophilen Aminosäuren können speziell präparierte Platten, deren Plastikmatrix mit hydrophilen Gruppen durchsetzt ist, verwendet werden. Der Nachweis der Antigen-Antikörper-Bindung erfolgt durch eine Farbreaktion, indem meist ein spezifischer Antikörper mit einem farbstoffumsetzenden Enzym, wie Meerrettichperoxidase (HRP, von engl. *horseradish peroxidase*), Alkalische Phosphatase oder seltener Glucoseoxidase, gekoppelt wird. Durch Zugabe eines zum Enzym passenden chromogenen Substrats kann die Farbreaktion durch Messung der Absorption durch ein Spektrometer quantitativ erfasst werden und damit Rückschlüsse auf die Menge des zu analysierenden Antikörpers bzw. Antigens gezogen werden. Durch die katalytische Aktivität des Enzyms kommt es zu einer Amplifikation des Signals, so dass auch geringe Mengen der nachzuweisenden Substanz gemessen werden können (Luttmann et al. 2009).

Im Prinzip werden vier ELISA Typen unterschieden:

- direkter ELISA
- indirekter ELISA
- Sandwich ELISA
- kompetitiver ELISA

Im Folgenden sollen nur der indirekte ELISA und der Sandwich ELISA beschrieben werden, da nach ihrem Prinzip in der vorliegenden Arbeit der α -Synuclein Autoantikörper Serum ELISA (indirekter ELISA) und der α -Synuclein Serum ELISA (Sandwich ELISA) entwickelt wurden.

Der indirekte ELISA ist die klassische Methode zum Nachweis spezifischer Antikörper im Serum. Zunächst wird das Zielantigen des zu quantifizierenden Antikörpers an die Plattenoberfläche gebunden. Überschüssige Bindungsstellen an der Polystyrenoberfläche müssen anschließend durch ein neutrales Protein, das keine Kreuzreaktivität mit dem Antikörper zeigt, blockiert werden, um unspezifische Bindung zu verhindern. Das zu untersuchende Testserum kann in einer einzigen Verdünnung (vor allem bei epidemiologischen Untersuchungen einer großen Anzahl von Seren) oder als eine Verdünnungsreihe in die beschichteten Wells gegeben werden. Nach Inkubation werden die restlichen ungebundenen Serumbestandteile entfernt und ein enzymmarkierter Antikörper (=Detektionsantikörper), der sich gegen den konstanten Anteil der schweren Kette des zu analysierenden Antikörpers richtet, hinzugegeben. Der Detektionsantikörper ist für die Spezies, aus der die jeweiligen Testprobe stammt, spezifisch (*anti-human*, *anti-murin*, usw.) und kann selektiv eine Immunglobulin (Ig) Klasse (IgG₁, IgG₂, IgM, IgE, usw.) durch Bindung an der F_C-Kette des Ig-Moleküls erkennen. Die Menge des spezifischen Antikörpers, der an das immobilisierte Antigen gebunden hat, kann durch die Messung der Absorption nach Zugabe einer chromogenen Substanz bestimmt werden. Abb. 4 zeigt den schematischen Aufbau eines indirekten ELISAs.

Der große Vorteil des indirekten ELISA Verfahrens ist seine schnelle und einfache Durchführbarkeit sowie seine hohe analytische Sensitivität, so dass es sich für die gleichzeitige Untersuchung vieler Proben besonders gut eignet. Die Einfachheit des Prinzips geht allerdings zu Lasten der analytischen Spezifität. Die unspezifische Bindung von Serumbestandteilen an die Plattenoberfläche, Kreuzreaktionen oder Interaktionen von Serumbestandteilen mit dem immobilisierten Zielantigen, dem zu analysierenden Antikörper oder dem Detektionsantikörper können erheblichen Einfluss auf die Assay-Leistung nehmen.

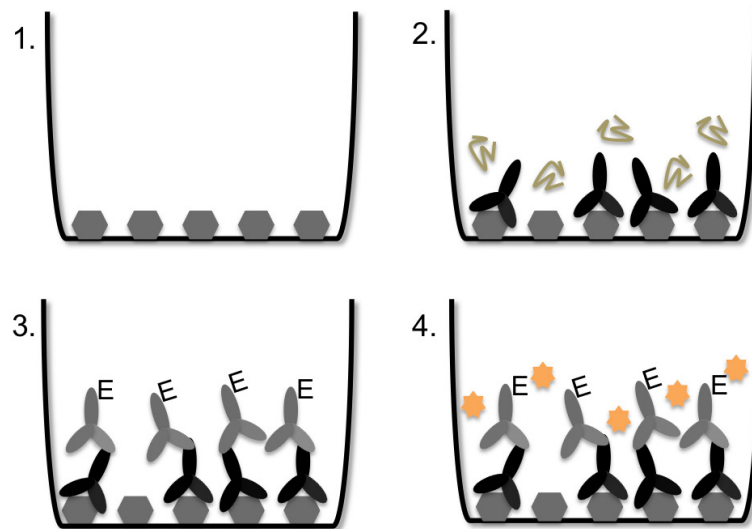


Abb. 4: Aufbau eines indirekten ELISAs. Schematische Darstellung der Durchführung eines indirekten ELISAs. Antigen wird an die feste Phase gebunden (1); Antikörper aus einer biologischen Probelösung binden an das Antigen. Unspezifische Komponenten (w) der Probelösung binden nicht (2); gebundener Antikörper wird durch enzym-markierten Detektionsantikörper (E) erkannt (3); durch Zugabe einer chromogenen Lösung (★) erfolgt eine Farbreaktion (4).

Beim Sandwich ELISA handelt es sich um eine weitere Technik des Immunoassays zur Detektion und Quantifikation von Peptiden und Antikörpern in Testlösungen. Dabei wird das zu analysierende Zielantigen von zwei möglichst spezifischen Antikörpern (d.h. am besten monoklonale Antikörper) entweder am gleichen Epitop (symmetrisch) oder an verschiedenen Epitopen (asymmetrisch) erkannt und gebunden. In der am häufigsten angewandten Form des Assays wird ein sogenannter Fängerantikörper (engl. capture antibody) an die Microtiterplatte immobilisiert. Anschließend erfolgt die Inkubation mit der Testprobe (Serum, Liquor, usw.), die das zu bestimmende Antigen enthält. Nach Bindung wird die Platte gewaschen und ein Detektionsantikörper hinzugegeben, der das am Fängerantikörper gebundene Antigen ebenfalls erkennt. Der Detektionsantikörper kann selbst mit einem Enzym markiert sein oder er wird durch einen Enzym-markierten Sekundärantikörper an seiner klassen- und speziesspezifischen F_C -Kette erkannt. Zur Minimierung unspezifischer Bindungen werden die Antikörper mit einem inerten Protein und einem milden Detergenz in optimaler Konzentration verdünnt. Die quantitative Auswertung erfolgt ebenfalls wie beim indirekten ELISA durch Messung der Absorption nach der Farbreaktion.

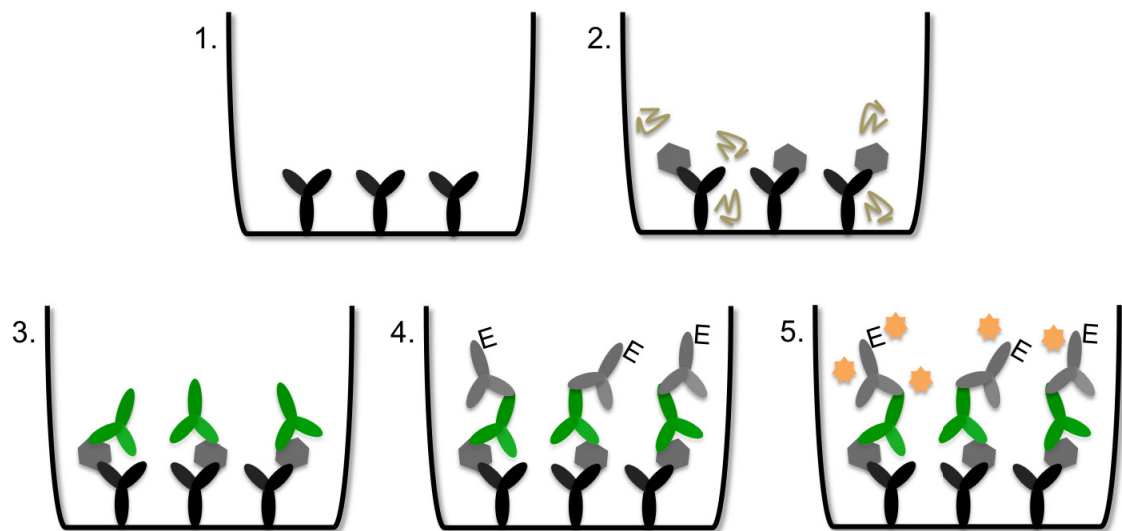


Abb. 5: Aufbau eines Sandwich ELISAs. Schematische Darstellung der Durchführung eines Sandwich ELISA. Fängerantikörper werden an die Oberfläche gebunden (1); Zielantigen aus der biologischen Probelösung bindet an Fängerantikörper. Unspezifische Komponenten (w) der Probelösung binden nicht (2); Detektionsantikörper erkennt ebenfalls Zielantigen (3); Enzym-markierter Sekundärantikörper (E) erkennt Detektionsantikörper an der F_C-Kette (4); Durch Zugabe einer chromogenen Lösung (★) erfolgt eine Farbreaktion (5).

5.3.2 Protokoll: α -Synuclein Autoantikörper Serum ELISA

IWAKI 96 Well Platten wurden zur Hälfte mit rekombinatem α -Synuclein beschichtet. Dabei wurde das zuvor gelöste α -Synuclein (2mg/ml; siehe *Probenvorbereitung Western Blot*) in Beschichtungspuffer (Phosphatpuffer) auf 3 μ g/ml verdünnt. Die Wells wurden mit je 100 μ l α -Synuclein Lösung (=beschichtet) oder reinem Beschichtungspuffer (=unbeschichtete Kontrolle) befüllt und die Platte über Nacht für ca. 16 Stunden bei 4°C inkubiert. Nach Inkubation wurden die Wells vorsichtig über Kopf entleert und die Platte auf Zellstofftüchern trocken geklopft. Zur Blockierung überschüssiger Bindungsstellen auf der Polystyrenoherfläche wurden die Wells mit 300 μ l Blockierungspuffer befüllt und die Platte bei Raumtemperatur für 2 Stunden mit 100rpm geschüttelt. In der Zwischenzeit wurden die Serumproben von -80°C und der Standard (affinitätsgereinigter und aufkonzentrierter IVIg Autoantikörper) von -20°C auf Eis aufgetaut. Das Serum wurde 1:100 in Reagiergefäßen mit Verdünnungspuffer verdünnt. Eine Standardreihe aus 6,5 bis 0,10 μ g/ml affinitätsgereinigtem IVIg Autoantikörper wurde ebenfalls in Reagiergefäßen in Verdünnungspuffer angesetzt. Bis zum Auftragen auf die Platte wurden das verdünnte Serum und die Standardreihe auf Eis gelagert. Die Platte wurde mittels Plattenwaschgerät drei Mal mit 300 μ l pro Well

Waschlösung gespült und im Anschluss ausgeklopft. Die Wells wurden mit 100µl Serum oder Standard befüllt und bei Raumtemperatur mit 100rpm geschüttelt. Jede einzelne Serumprobe wurde dabei mindestens doppelt in beschichteten wie unbeschichteten Wells inkubiert, um anschließend den Anteil der unspezifischen Bindung an die Plattenoberfläche für jede einzelne Probe bestimmen zu können. Als Leerwert dienten je zwei beschichtete bzw. unbeschichtete Wells, die mit reinem Verdünnungspuffer gefüllt wurden. Nach einer Stunde wurde die Platte erneut gewaschen, ausgeklopft und der Detektionsantikörper hinzugeben. Dabei wurde der mit Peroxidase gekoppelte *anti-human* Antikörper 1:5000 in Verdünnungspuffer gelöst und zu je 100µl in die Wells pipettiert. Nach einer Stunde Inkubation erfolgte der letzte Waschschrift. Die Platten wurden fünf Mal mit 300µl Waschlösung gespült und ausgeklopft. Die enzymatisch bedingte Farbreaktion wurde durch Zugabe von 100µl pro Well des Farbreagenz TMB gestartet. Die Reaktion erfolgte unter Lichtausschluss durch Abdeckung der Platte mit Aluminiumfolie für ca. 10-15min. Durch Zugabe von 25µl 2N Schwefelsäure wurde die Farbreaktion gestoppt. Es entstand ein Farbumschlag von blau zu gelb und die Lichtabsorption wurde bei 450nm unverzüglich durch den *ELISA Platereader* gemessen. Der Absorptionswert der Leerwerte wurde von allen Proben abgezogen. Bei jeder einzelnen Serumprobe wurde ein Differenzwert durch Subtraktion des Absorptionswertes der unbeschichteten Wells vom Wert der beschichteten Wells gebildet. An Hand der Geradengleichung, die sich aus den Absorptionswerten des Standards und der eingesetzten Konzentration ergab, konnte mit Hilfe des Differenzwertes auf die Antikörperkonzentration in den einzelnen Serumproben rückgeschlossen werden.

5.3.3 Protokoll: α -Synuclein Serum ELISA

Eine Nunc 96 Well Platte wurde mit 100µl pro Well 0,3µg/ml MCA 2A7 Antikörper in Beschichtungspuffer (Carbonatpuffer) beschichtet und über Nacht für ca. 16 Stunden bei 4°C inkubiert. Anschließend wurde die Platte vier Mal mit je 250µl pro Well Waschlösung gewaschen und ausgeklopft. Überschüssige Bindungsstellen auf der Plattenoberfläche wurden mit 250µl Blockierlösung für zwei Stunden bei Raumtemperatur abgesättigt. Zwischenzeitlich wurden die zu analysierenden Serumproben von -80°C und das zuvor gelöste α -Synuclein als Standard von -20°C auf Eis aufgetaut. Serum wurde 1:3 in PBS verdünnt. Eine Standardreihe wurde zwischen 50 bis 1,56ng/ml α -Synuclein in PBS in Reagiergefäßen angelegt. Die Platte wurde nach der Blockierung

erneut vier Mal mit 250µl Waschlösung pro Well gespült. Serum und Standard wurden zu je 100µl pro Well für zwei Stunden bei Raumtemperatur und 100rpm inkubiert. Anschließend erfolgte erneutes Waschen der Platte und Zugabe des Detektionsantikörpers FL 140 (4µg/ml) in 100µl pro Well Blockierungspuffer für eine Stunde bei Raumtemperatur und 100rpm. Nach viermaligem Waschen wurde der mit alkalischer Phosphatase gekoppelte *anti-rabbit* Sekundärantikörper 1:200 in Blockierungspuffer gelöst und in 100µl pro Well für eine Stunde bei obigen Bedingungen inkubiert. Nach letztmaligem Waschen wurde die Farblösung hinzugegeben. Dazu wurde, wie vom Hersteller beschrieben, Lösung A und B des *Alkaline Phosphatase Blue Microwell Substrate Kit* 1:1 vermischt und zu je 200µl pro Well auf die Platte gegeben. Die Absorption wurde nach 30 Minuten Entwicklungszeit mittels *ELISA Platereader* bei einer Wellenlänge von 620nm gemessen. Die Konzentration von α -Synuclein im Serum wurde mittels der Geradengleichung, die sich aus den Absorptionswerten der Standardreihe und der eingesetzten Konzentration ergab, ermittelt.

5.3.4 Validierung der etablierten ELISAs

Die Validierung einer bioanalytischen Methode ist einer der wesentlichsten Bestandteile in der Methodenetablierung. Sie dokumentiert, dass die Messmethode verlässliche Ergebnisse nach zuvor gesetzten Kriterien liefert (Findlay et al. 2000; Swann and Shapiro 2011). In der vorliegenden Arbeit wurden sowohl der indirekte Autoantikörper ELISA sowie der α -Synuclein ELISA nach folgenden Kriterien für die Messung von Serumproben validiert:

- Analytische Spezifität und Sensitivität
- Linearität
- Genauigkeit
- Präzision

Die Definition und praktische Umsetzung der einzelnen Begriffe wurden zum besseren Verständnis in den jeweiligen Kapiteln der Methodenetablierung des Autoantikörper und α -Synuclein ELISAs beschrieben. Es ist anzumerken, dass die obigen Begriffe in der Literatur nicht einheitlich definiert werden bzw. bisweilen auch nur unscharf zu trennen sind. Häufig wird z.B. die Genauigkeit unter den Begriff der Spezifität

subsumiert. Die hier verwendete Terminologie beruft sich immer auf die dazu unmittelbar angehenden Quellen.

5.4 Untersuchungsmaterial: Serum von Patienten und gesunden Kontrollpersonen

5.4.1 Probandenrekrutierung und Datenerhebung

Im Rahmen der Studie wurden das Serum von insgesamt 152 Probanden hinsichtlich der Konzentration des natürlich vorkommenden Autoantikörpers gegen α -Synuclein sowie der Konzentration des α -Synuclein Peptids untersucht. Die Probanden setzten sich dabei aus 63 Patienten mit IPS, 43 Patienten mit Alzheimer Demenz (AD) und 46 gesunden Kontrollpersonen zusammen. Auf Grund nicht ausreichenden Serummaterials konnte allerdings nur bei 34 Patienten mit IPS das α -Synuclein Peptid bestimmt werden.

Die Patienten mit IPS wurden während ihres stationären oder ambulanten Aufenthalts in der neurologischen Universitätsklinik Marburg, der Parkinson-Klinik Bad Nauheim und der Universitätsklinik für Neurologie Innsbruck rekrutiert. Das IPS wurde gemäß den klinischen Kriterien der *UK PD Society Brain Bank* (Gibb 1988) durch einen erfahrenen Neurologen diagnostiziert. Bei allen Patienten wurden im Rahmen der klinischen Untersuchung Alter, Geschlecht, Dauer der Erkrankung, Erkrankungsbeginn und die Schwere der Erkrankung nach Hoehn und Yahr Stadium (Hoehn and Yahr 1967) erhoben. Die Hoehn und Yahr-Stadien dienen der schnellen klinischen Orientierung des Schweregrads und der Progression des IPS im Krankheitsverlauf. Wesentliche Differenzierungskriterien zwischen den Stadien sind dabei die einseitige oder beidseitige Krankheitsmanifestation, sowie das Vorliegen einer leichten bis schweren Haltungsinstabilität. Man unterscheidet insgesamt 5 verschiedene Stadien (siehe Anhang *Klinische Beurteilungsskalen*). Bei 34 Parkinsonpatienten wurde zusätzlich der motorische Untersuchungsteil der *Unified Parkinson Disease Rating Scale* (UPDRS) (Martinez-Martin et al. 1994) erhoben. Bei der UPDRS handelt es sich um ein wesentlich differenzierteres Untersuchungsinstrument, bei dem neben der motorischen Funktion zusätzlich die kognitive Funktion, Verhalten und Stimmung, Aktivitäten des täglichen Lebens sowie Komplikationen der Behandlung erhoben werden können. Der motorische Anteil besteht aus 14 verschiedenen Items, die

unterschiedliche motorische Funktionen wie Sprache, Mimik, Tremor, Rigidität, Diadochokinese, Bradykinese, Haltung, Gang und Haltungsstabilität beinhalten (siehe Anhang *Klinische Beurteilungsskalen*). Alle Patienten waren bei Einschluss in die Studie unter Medikation und befanden sich zum Zeitpunkt der Erhebung des UPDRS im motorischen „on-Zustand“. Es wurden Patienten mit allen Schweregraden der Erkrankung in die Studie eingeschlossen.

Patienten mit AD und gesunde Kontrollpersonen wurden an der Klinik und Poliklinik für Psychiatrie und Psychotherapie der Universität Bonn rekrutiert. Die Diagnose AD wurde an Hand der klinischen Kriterien für eine wahrscheinliche Alzheimererkrankung des *National Institute of Neurological and Communicative Disorders and Stroke* und der *Alzheimer Disease and Related Disorders Association* (NINCDS-ADRDA) (McKhann et al. 1984) und den DSM-IV Kriterien für Demenz des Alzheimer Typs gestellt. Im Rahmen der Diagnosestellung erfolgte eine klinische und neuropsychologische Testung inklusive Mini-Mental-State Examination (MMSE; Folstein et al. 1975). Gesunde Kontrollpersonen wurden als gesund im Sinne des Fehlens einer neurodegenerativen oder anderen neurologischen Erkrankung, einer schweren Infektionserkrankung, eines Immundefizits oder eines Tumorleidens definiert und erzielten im MMSE einen Wert ≥ 28 .

Zusätzlich wurden aus dem Liquorlabor der Klinik für Neurologie der Universität Marburg zehn Liquorproben zur Etablierung des Autoantikörper ELISAs für Liquor verwendet. Die Proben stammten von neurologischen Patienten, bei denen zum Ausschluss eines entzündlichen zentralnervösen Prozesses oder zu therapeutischen Zwecken eine Liquorpunktion im Rahmen der klinischen Versorgung durchgeführt worden war.

Die Studienprotokolle zur Patientenrekrutierung wurden von der jeweiligen zuständigen Ethikkommission geprüft. Im Falle der an der Universität Marburg und der Parkinson-Klinik Bad Nauheim rekrutierten Patienten erfolgte das positive Ethikvotum durch die Ethikkommission des Fachbereichs Medizin (Aktenzeichen: Studie 4/08) und der Landesärztekammer Hessen. Alle Studienteilnehmer gaben ihre schriftliche Einwilligung zur Teilnahme an der Studie im Sinne eines *informed consent* nach den Richtlinien der Deklaration von Helsinki.

5.4.2 Serumgewinnung und Lagerung

Die Blutentnahme erfolgte im Rahmen der klinischen Untersuchung. Vollblut wurde durch Punktion einer Armvene gewonnen. Durch Aspiration wurde das Blut in eine spezielle Plastikmonovette für Serum gezogen. Die Serum-Monovetten wurden für 15min aufrecht bei RT stehen gelassen und anschließend mit 2500xg für 10 Minuten bei 23°C zentrifugiert. Das Serum, das sich als Überstand über dem Blutkuchen bildete, wurde mittels Pipette in 1,5ml Reagenzgefäße überführt und bis zum Gebrauch bei -80°C eingefroren. Zum Zeitpunkt der Analyse waren die Proben von IPS-Patienten $2,2 \pm 1,5$ Jahre (Mittelwert \pm Standardabweichung), AD-Patienten $2,4 \pm 0,2$ Jahre und von gesunden Kontrollen $2,3 \pm 0,3$ Jahre dauerhaft eingefroren gewesen.

5.5 Statistische Auswertung

5.5.1 Auswertung der Messdaten

Die statistische Auswertung der Ergebnisse erfolgte mit SigmaStat Software (Version 3.5, SigmaStat, San Jose, Ca, USA). Die Prüfung auf Normalverteilung der erhobenen Daten erfolgte mittels Kolomogorov-Smirnov- und Shapiro-Wilk-Test. Zum Vergleich der demographischen und klinischen Daten untereinander und mit den gemessenen Konzentrationen der Assays wurden parametrische und nicht-parametrische Tests verwendet. ANOVA und Kruskal-Wallis Analyse wurden beim Vergleich multipler Gruppen verwendet. Eine *Post-hoc* paarweise Vergleichsanalyse der Gruppen mit Bonferroni *t*-Test bei ANOVA und Dunn's (Bonferroni) Test bei Kruskal-Wallis wurde bei signifikanten Ergebnissen durchgeführt. Zum Nachweis einer Korrelation zwischen Antikörperkonzentrationen im Serum und demographischen und klinischen Daten erfolgte ein Test auf lineare Regression nach Pearson oder im Fall nicht normal verteilter Variablen eine Rang Korrelation nach Spearman. Bei allen Tests wurde ein *p*-Wert kleiner 0,05 als signifikant erachtet. Das jeweils verwendete Testverfahren wird im Ergebnisteil unmittelbar nach Angabe des Testergebnisses angegeben.

5.5.2 Auswertung der diagnostischen Testgüte

Nach der analytischen Validierung einer Methode schließt sich bei ihrer Verwendung zur Krankheits- oder Symptomdifferenzierung die diagnostische Validierung an. Die dabei entscheidenden Kenngrößen sind die diagnostische Sensitivität und Spezifität (in

Abgrenzung zu der analytischen Sensitivität und Spezifität als feste biophysikalische Eigenschaft der Methodik). Unter Sensitivität wird die bedingte Wahrscheinlichkeit verstanden, dass ein Test bei Vorliegen einer Erkrankung richtigerweise positiv reagiert. Spezifität gibt dagegen die bedingte Wahrscheinlichkeit an, dass ein Test bei Fehlen der Erkrankung richtigerweise negativ ausfällt. Die Sensitivität wird als Prozentsatz der positiven Testbefunde unter allen tatsächlich Kranken und die Spezifität als Prozentsatz aller negativen Testbefunde unter den tatsächlich Gesunden (nicht Kranken) angegeben. Voraussetzung für eine solche Qualifizierung ist das Wissen über das Vorliegen der Erkrankung durch ein Goldstandardverfahren. In der vorliegenden Arbeit erfolgte die Diagnostizierung vorweg durch anerkannte validierte Kriterien (siehe Kapitel 5.4.1). In einem idealen Testverfahren nehmen Sensitivität und Spezifität den Wert 1 (bzw. 100%) an. In der Realität vorkommende falsche Testergebnisse, z.B. positives Testergebnis bei tatsächlichem Fehlen der Krankheit, werden dementsprechend als falsch positiv bzw. im umgekehrten Fall als falsch negativ klassifiziert. Um die Sensitivität und Spezifität ermittelt zu können, wird eine binäre Testentscheidung nach positiv oder negativ bzw. krank oder nicht krank vorausgesetzt. In den meisten Fällen, wie auch in der vorliegenden Arbeit, beruhen dagegen die Testergebnisse auf biophysikalischen Messungen, deren Größen einer stetigen Merkmalsausprägung folgen. Im konkreten Fall wurde die Konzentration des Autoantikörpers gegen α -Synulcein gemessen. Um das Messergebnis in eine binäre Merkmalsausprägung zu transformieren, muss zuvor ein Schwellenwert (engl. *cut-off value*) festgelegt werden, der ein positives von einem negativen Testergebnis trennt. Liegt zum Beispiel eine gemessene Konzentration unterhalb des Schwellenwertes wird das Testergebnis je nach Definition als positiv oder negativ, aber als eindeutig zuordnungsbar, bewertet. Der Schwellenwert beeinflusst damit direkt die Sensitivität und Spezifität des Testes (Weiß 2010). Zur Beurteilung der Abhängigkeit der Sensitivität und Spezifität vom Schwellenwert wird im Allgemeinen eine *receiver operating characteristic* (ROC) Analyse verwendet. Bei der ROC Analyse handelt es sich um eines der akkuratesten Verfahren, um das Vermögen eines diagnostischen Tests zu bewerten, an Hand eines beliebigen Schwellenwertes zwischen zwei Zustandsformen (z.B. krank vs. nicht krank) unterscheiden zu können (Boyd 1997). Die ROC Kurve ergibt sich aus der Berechnung des Wertepaars Sensitivität und Spezifität für alle theoretisch möglichen Schwellenwerte innerhalb des Messbereichs. Dabei wird die Sensitivität entlang der Ordinate und die Differenz 1-Spezifität entlang der Abszisse aufgetragen. Als Maß für die Güte des Tests wird im Allgemeinen die Fläche unterhalb

der ROC Kurve (AUC: *area under curve*) angeben, die einen Wert zwischen 0,5 und 1 annehmen kann. Der diagnostische Test weist dann eine Trennschärfe auf, wenn sich die ROC Kurve und damit die AUC signifikant von der Diagonalen, die genau 50% (0,5) der Fläche unter sich einschließt, unterscheidet (Hanley and McNeil 1982). Die ROC Analyse und die Berechnung der ROC Kurve erfolgten mit SPSS (Version 19.0.0, SPSS Inc., Chicago, IL, USA). Der Schwellenwert zur Bestimmung der optimalen Sensitivität und Spezifität der diagnostischen Methode kann unterschiedlich definiert werden und richtet sich prinzipiell nach dem Verwendungszweck des Tests. Ein optimaler Schwellenwert beruht demnach nicht auf wahrscheinlichkeitstheoretischen, sondern auf praktischen und medizinisch nützlichen Überlegungen (Weiß 2010). In der vorliegenden Arbeit wurden demnach unterschiedliche Verfahren zur Festlegung des Schwellenwertes und der daraus folgenden Sensitivität und Spezifität verwendet. Hierzu gehörte der Summationsindex nach Youden (Youden-Index: maximaler Wert = Sensitivität + Spezifität - 1 für alle Schwellenwerte) (Youden 1950) und die *Two-Graph*-ROC Analyse (Greiner et al. 1995). Bei Letzterem werden die Sensitivität und Spezifität als Funktion der möglichen Schwellenwerte zusammen in ein Diagramm aufgetragen. Der Überschneidungspunkt der Kurven (Sensitivität = Spezifität) gibt unter der Prämisse der gleichen Gewichtung von Sensitivität und Spezifität einen möglichen Schwellenwert des Assays. Ein dritter Schwellenwert wurde nach praktisch-klinischen Gesichtspunkten durch die Festlegung einer Sensitivität von mindestens 85% erhoben.

6 ERGEBNISSE

6.1 Bindungsspezifität des affinitätsgereinigten IVIg Autoantikörpers im Western-Blot

Der aus IVIg affinitätsgereinigte und aufkonzentrierte natürlich vorkommende Autoantikörper gegen α -Synuclein wurde vor seinem Einsatz in der ELISA Etablierung bezüglich seines Bindungsverhaltens gegen α -Synuclein untersucht. Als Positivkontrolle diente der monoklonale Antikörperklon Syn211 (mAb211). Beide Antikörper detektierten dosisabhängig die monomere Form des rekombinanten α -Synucleins zwischen 14 und 17kDa (Abb. 6). Überraschenderweise erkannte der aus IVIg isolierte Antikörper trotz vorangegangener Denaturierung des rekombinanten α -Synucleins aggregierte Formen nahe der Referenzbanden 28 und 42kDa. Sie entsprachen am ehesten der Di- und Trimeren Form des α -Synucleins. Durch den positiven Nachweis des α -Synucleins konnte der affinitätsgereinigte Autoantikörper aus IVIg in der nachfolgenden ELISA Etablierung als Standard und Referenzprobe verwendet werden.

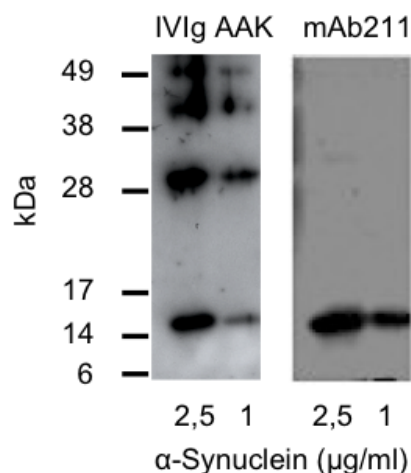


Abb. 6: Western-Blot zur Prüfung der Bindungsspezifität des affinitätsgereinigten IVIg Autoantikörpers. Rekombinantes α -Synuclein (2,5 und 1 µg/ml) wurde in einem 12% Gel (Invitrogen) getrennt. Die Detektion erfolgte mit dem affinitätsgereinigten IVIg Autoantikörper (IVIg AAK) und mit dem monoklonalen Antikörperklon Syn211 (mAb211) als Positivkontrolle. Das α -Synuclein Monomer wurde von beiden Antikörpern zwischen der 14 und 17kDa Bande erkannt. Der IVIg Autoantikörper erkannte zusätzlich aggregiertes α -Synuclein im Bereich von 28 und 42kDa, was am ehesten dem Di- und Trimer des α -Synucleins entsprach.

6.2 Etablierung des α -Synuclein Autoantikörper Serum ELISAs – Schritt I: Aufbau

6.2.1 Grundannahmen zur Etablierung

Vorrangiges Ziel dieser Arbeit war es, einen indirekten ELISA zur Detektion und quantitativen Bestimmung des natürlich vorkommenden Autoantikörpers gegen α -Synuclein im humanen Serum zu entwickeln. Ein solcher ELISA wurde bislang nicht publiziert, so dass auf kein fertiges Protokoll zurückgegriffen werden konnte. Wie im Kapitel *ELISA theoretische Hintergründe* schon beschrieben wurde, besteht eine ELISA Anwendung aus mehreren hintereinander aufbauenden Schritten: Beschichtung der Platte mit Antigen, Blockierung überschüssiger Bindungsstellen, Inkubation der Serumprobe, Zugabe eines Detektionsantikörpers und enzymatische Farbentwicklung. Aus diesem prinzipiellen Ablauf ließen sich eine Reihe von Faktoren ableiten, die bei der Etablierung eines Assays bedacht werden mussten. Hierzu gehörte die Bestimmung eines geeigneten Puffersystems zur Antigen-Antikörper-Bindung, einer geeigneten Reaktionstemperatur, der Dauer der einzelnen Inkubationsschritte, passender Blockierungs- und Verdünnungslösungen und einer ganzen Reihe andere Parameter von Plattenart bis Farbreaktion. Daraus ergab sich ein n-faches an Kombinationsmöglichkeiten, die schlichtweg nicht alle berücksichtigt werden konnten. Zu Beginn der Etablierung wurde daher ein festes zeitliches Protokoll herangezogen, das sich bei vielen ELISA unterschiedlichster Fragestellungen bewährt hatte (Abb. 7).

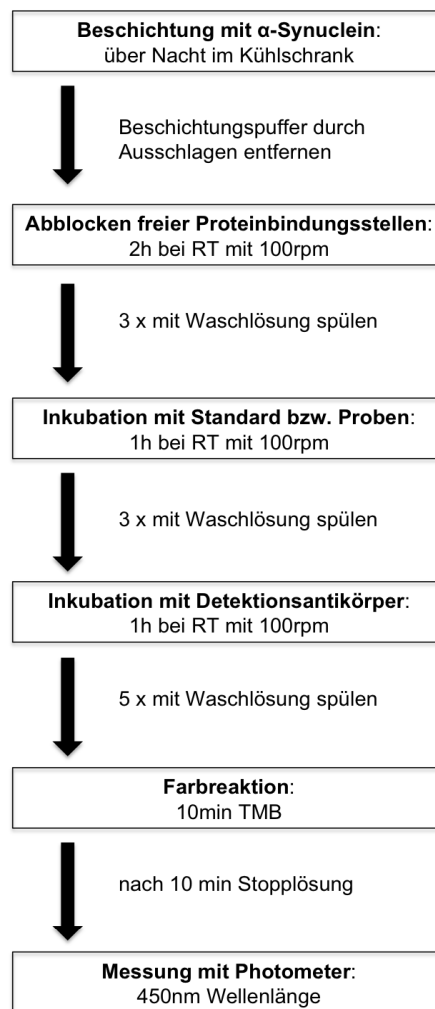


Abb. 7: Ausgangsprotokoll des indirekten ELISAs. Modifiziert nach Luttmann et al. (2009)

Des Weiteren wurden einige Punkte vor dem Etablierungsbeginn zunächst festgelegt:

- Alle Reaktionen von der Beschichtung bis zur Antigen-Antikörperbindung sollten bei fast physiologischen pH Verhältnissen (zwischen pH 7,4-7,6) ablaufen, um möglichen Konformationsänderungen der Bindungspartner, insbesondere eine Fibrillierung des α -Synucleins, zu verhindern. Es wurde daher ein passender Beschichtungspuffer, sowie PBS als Grundpuffer für alle weiteren Lösungen gewählt.
- Als Entwicklungslösung wurde lösliches TMB verwendet, dass nach Zugabe von 2N H_2SO_4 einen Farbumschlag von blau zu gelb vollzieht und ein Absorptionsmaximum bei 450 nm aufweist. Passend dazu wurde ein

kommerziell erhältlicher Detektionsantikörper gesucht, der mit Peroxidase gekoppelt ist und spezifisch den konstanten Anteil (F_C-Kette) humaner IgG erkannte.

- Zur Etablierung wurde zunächst eine Plattenart verwendet (IWAKI). Diese Platten bestehen aus Polysytren, einem für Immunoassays gängigem Kunststoff, dessen Oberfläche durch den Hersteller speziell vorbehandelt wurde, um Peptide mit hydrophoben und hydrophilen Anteilen zu binden (= *high bind* Platte). Im späteren Verlauf wurden schließlich unterschiedliche ELISA-Platten verschiedener Hersteller und Beschaffenheit im Vergleich getestet.
- Die Platten wurden initial mit 2µg/ml rekombinantem α-Synuclein beschichtet, bevor nach Optimierung der Blockierungs- und Verdünnungspuffer verschiedene Konzentrationen getestet wurden.

Um eine relative Vergleichbarkeit hinsichtlich des Nutzens der jeweils getesteten Modifikationen vom Ausgangsprotokoll herzustellen, wurden Serumproben unterschiedlicher Parkinson-Patienten ausgewählt und für eine gemeinsame Stocklösung (Serumpool) zu gleichen Anteilen zusammenpipettiert. Dies geschah unter der Annahme, dass durch Herstellung eines Serumpools eine repräsentative Serumprobe erzeugt werden konnte, die sich in ihren Eigenschaften, wie der Antikörperkonzentration oder unspezifischen Matrixeffekten, einem zu erwartenden Durchschnittswerten annähert. Der Pool wurde für die gesamte Assay Etablierung standardmäßig verwendet. Zur Herstellung wurden zehn individuelle Serumproben verwendet. Der Serumpool wurde aliquotiert und bis zum jeweiligen Gebrauch bei -80°C gelagert. Zur Etablierung wurden Standard-, Referenz- und Serumproben immer in dreifacher Ausführung (3 Wells parallel) gemessen. Jeder Versuchsschritt wurde mindestens zwei Mal wiederholt, um das Ergebnis zu bestätigen.

6.2.2 Quantifizierung unspezifischer Hintergrundaktivität des Serums

Wie schon erwähnt, zeigen natürlich vorkommende Autoantikörper häufig polyreaktive Bindungseigenschaften und weisen im Vergleich zu exogen induzierten Antikörpern meist eine niedrige Affinität zu ihrem Zielantigen auf (Avrameas 1991; Lacroix-Desmazes et al. 1998; Notkins 2004). Vor diesem Hintergrund musste zunächst geprüft werden, wie stark sich das Signal der angestrebten Bindung des Autoantikörpers an α-Synuclein von der unspezifischen Hintergrundaktivität des Serums abheben kann. Bei Serum handelt es sich um ein komplexes proteinreiches

Medium, das durch eine Reihe von Eigenschaften Einfluss auf die analytische Sensitivität und Spezifität eines ELISAs nehmen kann. Es wurde daher zunächst der Anteil der unspezifischen Hintergrundaktivität des Serums am spezifischen Signal der Antigen-Antikörper-Bindung quantitativ erfasst. Hierfür musste das Signal, das sich nach Inkubation einer Serumprobe in α -Synuclein beschichteten Wells ergab, mit einer geeigneten Negativkontrolle verglichen werden. In der Literatur (siehe hierzu später Kapitel *Umgang mit der unspezifischen Hintergrundaktivität des Serums im Autoantikörper ELISA*) wird als Negativkontrolle die Messung des Signals der Serumprobe in unbeschichteten Wells im Vergleich zum Signal derselben Serumprobe in beschichteten Wells empfohlen. Das Signal aus unbeschichteten Wells musste als absolut unspezifisch gelten.

In den ersten Versuchen mit dem Ausgangsprotokoll und unter Verwendung von SuperBlock[®] als Blockierungspuffer zeigte sich in den unbeschichteten Wells ein Signal, das knapp 50% des Signals aus beschichteten Wells ausmachte (Abb. 8). Durch Kontrolle mittels Leerwert, also Messung der Absorption aus beschichteten und unbeschichteten Wells, die nicht mit Serum, sondern mit reinem PBS inkubiert wurden, konnte gezeigt werden, dass der Sekundärantikörper durch unspezifische Bindung an die Plattenoberfläche oder an das α -Synuclein einen vernachlässigbaren Anteil (< 3,8%) des Signals ausmachte. Daraus ergab sich die theoretische Überlegung, dass - unter Voraussetzung der hohen Spezifität des Sekundärantikörpers gegen humanes IgG – endogene polyreaktive Serumantikörper unspezifisch an der Plattenoberfläche binden konnten. Sie wurden neben dem Autoantikörper gegen α -Synuclein durch den Sekundärantikörper erkannt und machten somit einen Großteil des Absorptionssignals aus. So konnte gezeigt werden, dass durch Entfernung der IgG aus dem Serum durch Vor-Inkubation mit Protein G das Signal in den unbeschichteten Wells auf Werte im Bereich des Leerwerts reduziert werden konnte (Abb. 8). Bei Protein G handelt es sich um ein IgG-bindendes Protein aus der Zellwand von Bakterien der Gattung *Streptococcus*. Auf Grund seiner hohen Affinität zur F_c-Domäne von IgG Molekülen eignet es sich zur Aufreinigung bzw. Entfernung von Antikörpern aus Probenlösungen (Akerstrom and Bjorck 1986).

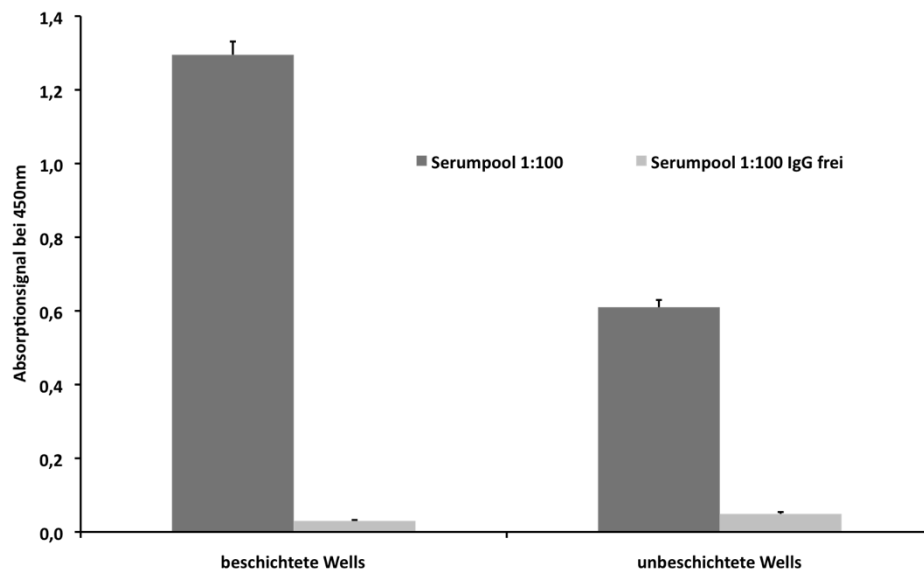


Abb. 8: Absorptionssignal gemessen in α -Synuclein beschichteten Wells und unbeschichteten Wells nach Inkubation mit Serumpool (1:100 verdünnt). Verwendet wurde das Ausgangsprotokoll mit Superblock® als Blockierungspuffer. Serumpool wurde zunächst 1:2 in PBS verdünnt, mit und ohne Protein G Pellets für eine Stunde unter kontinuierlicher Bewegung bei Raumtemperatur inkubiert, anschließend zentrifugiert und weiter mit PBS auf 1:100 verdünnt. Der Serumpool zeigte in unbeschichteten Wells ein Signal, das knapp 50% des Signals aus beschichteten Wells ausmacht. Durch Vor-Inkubation mit Protein G (Serumpool 1:100 IgG frei) ließ sich das Signal in beiden Wells auf Werte im Bereich des Leerwerts reduzieren. Mittelwerte (n=3) \pm Standardabweichung.

Ziel war es nun, diese unspezifische Serum IgG Bindung an der Plattenoberfläche durch Wahl einer geeigneten Blockierungs- und Verdünnungslösung zu minimieren. Als relatives Maß für die unspezifische Bindung wurde der Anteil des Signals, gemessen in unbeschichteten Wells, an dem Signal in beschichteten Wells bestimmt:

$$= \frac{\text{Absorption bei 450nm in unbeschichtete Wells}}{\text{Absorption bei 450nm in beschichtete Wells}} \times 100\%$$

6.2.3 Vergleich verschiedener Blockierungs- und Verdünnungslösungen

Die Wahl eines geeigneten Proteins oder Polymers zur Reduktion unspezifischer Bindung in einem ELISA stellt einen kritischen Schritt der Etablierung dar, da hier ein erheblicher Einfluss auf die spätere analytische Sensitivität und Spezifität des Assays genommen werden kann (Vogt et al. 1987). Dem Prinzip nach muss ein Protein oder Polymer gefunden werden, dass nach Beschichtung der Platte die übrig gebliebenen freien Plattenbindungsstellen absättigt bzw. bei Inkubation mit der Serumprobe eine

Bindung von Serum IgG an die Plattenoberfläche inhibiert. Daher wurde im Rahmen eines Screeningverfahrens eine Reihe in der Literatur beschriebener Blockierungsreagenzien (in PBS gelöst) und kommerziell erhältlicher Blockierungspuffer ausgetestet (Fujii et al. 1989; Kenna et al. 1985; Klaver et al. 2010; Vogt et al. 1987). Abb. 9 sortiert die geprüften Blockierungs- und Verdünnungslösungen nach ihrer Fähigkeit die unspezifische Bindung zu reduzieren. Alle Lösungen wurden mit dem einheitlich hergestellten Serumpool und nach dem ELISA Ausgangsprotokoll getestet.

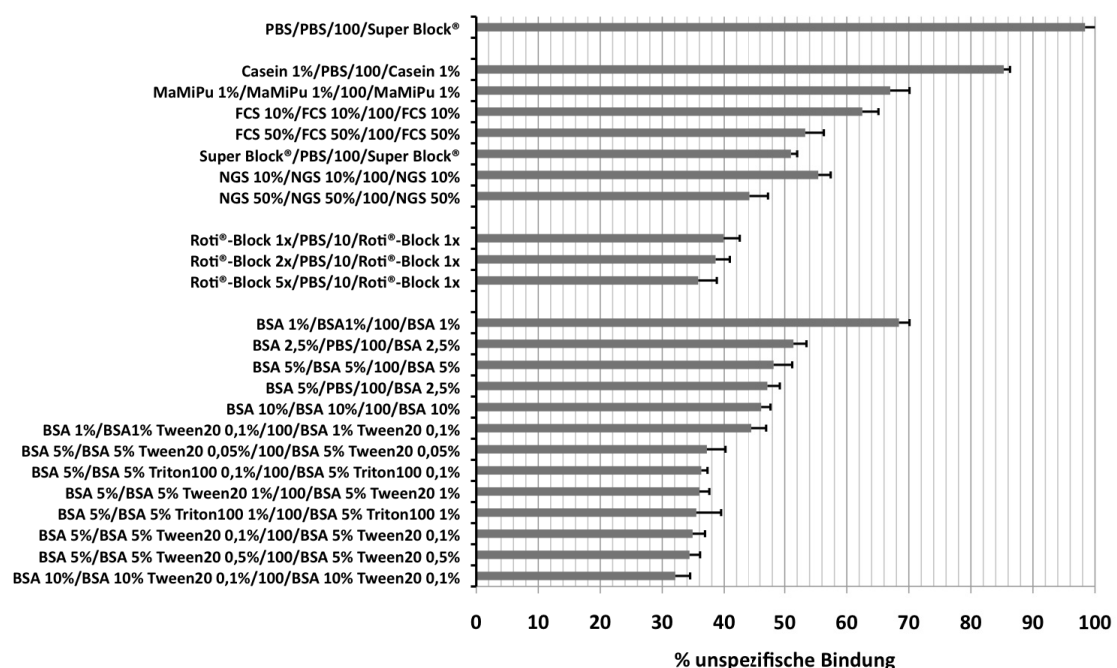


Abb. 9: Auflistung der getesteten Blockierungs- und Verdünnungslösungen. LESE: Blockierungslösung / Verdünnungslösung Serumpool / Verdünnungsfaktor Serumpool / Verdünnungslösung des Sekundärantikörpers. Angabe in Prozent der unspezifischen Bindung. MaMiPu = Magermilchpulver; FCS: fetales Kälberserum; NGS: normales Ziegenserum; BSA: bovines Serumalbumin. Mittelwerte (n=3) ± Standardabweichung.

In den initialen Untersuchungen erwies sich die Verwendung der kommerziell beziehbaren Blockierungspuffers SuperBlock® und Roti®-Block, sowie des bovinen Serumalbumins (engl. bovine serum albumine: BSA) in PBS als am besten geeignet. Roti®-Block führte zwar zu einer Reduktion der unspezifischen Bindung auf unter 40%, allerdings zu Lasten der allgemeinen Signalstärke (rohes Absorptionssignal), die sich auch bei einer Minderverdünnung des Serumpools auf 1:10 kaum anheben ließ. Die

Verwendung von SuperBlock® war durch die fixe Lösung nicht modulierbar und mit einer Signalreduktion von knapp 50% im Vergleich zu BSA nicht zufriedenstellend. BSA zeigte mit ansteigender Konzentration (1%, 5%, 10% BSA in PBS gelöst) eine Abnahme der unspezifischen Bindung. Der Zusatz eines mild wirksamen Detergenz (Tween20 oder Triton100), während der Inkubation der Serumprobe und des Detektionsantikörpers, führte zu einer deutlichen Zunahme des spezifischen Signals in beschichteten Wells (Abb. 10). Dabei zeigte sich zwischen Triton100 und Tween20 kein Unterschied.

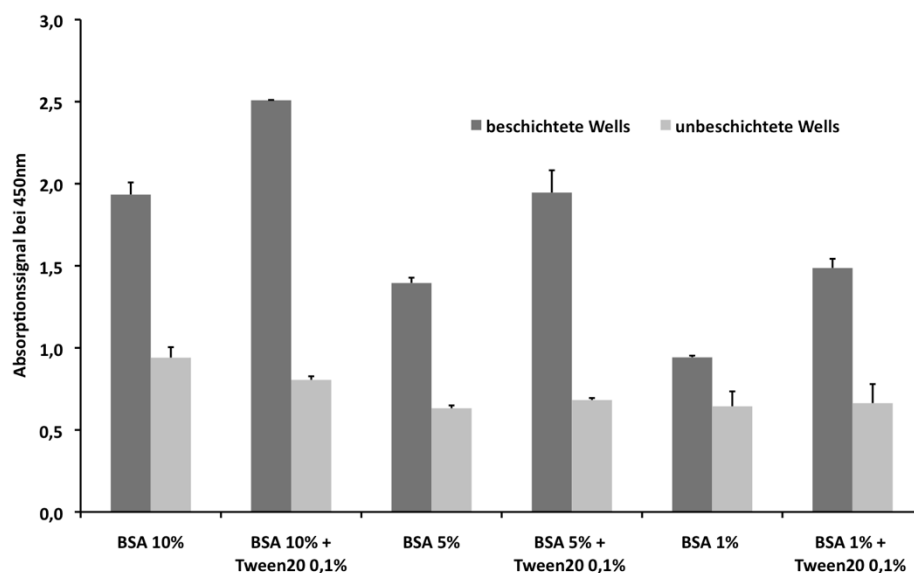


Abb. 10: Vergleich unterschiedlicher BSA Konzentrationen mit/ohne Zusatz von Tween20 0,1%. Wells wurden mit BSA 10, 5 oder 1% in PBS blockiert. Die Verdünnung der Serumprobe und des Detektionsantikörpers erfolgte ebenfalls in BSA mit oder ohne Zusatz von Tween20. Unter steigender BSA Konzentration nahm die Signalstärke des spezifischen Signals zu, wobei sich zwischen BSA 10% und 5% kein Zuwachs der Differenz zwischen beschichteten und unbeschichteten Wells mehr fand. Die Zugabe von Tween20 0,1% führte nur zu einem deutlichen Zuwachs des Signals in beschichteten Wells. Mittelwerte ($n=3$) \pm Standardabweichung.

Tween20 zeigte selbst keine blockierenden Eigenschaften in unbeschichteten Wells und seine Konzentrierung schien über weite Strecken keinen Einfluss auf seinen signalsteigernden Effekt zu haben (Abb. 11).

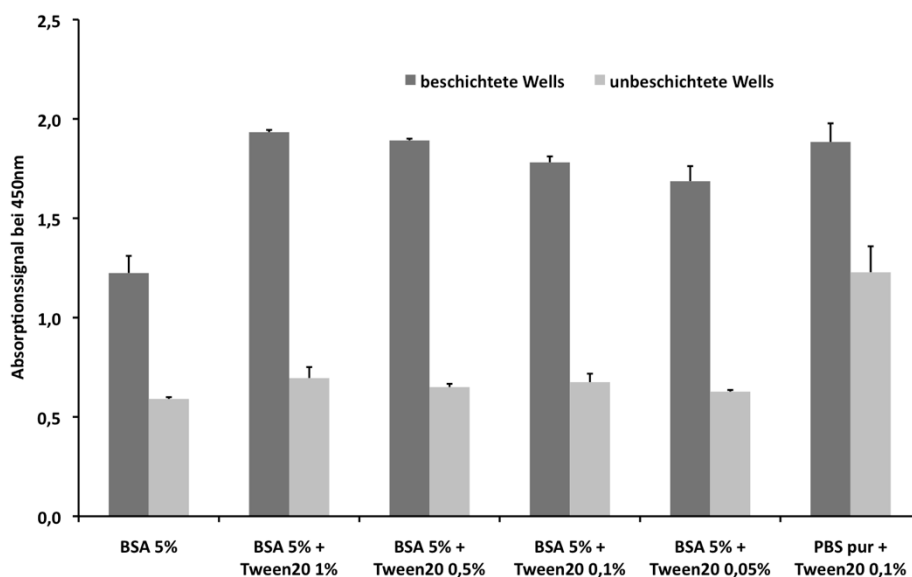


Abb. 11: Vergleich unterschiedlicher Tween20 Konzentrationen mit BSA 5% als Verdünnungspuffer. Wells wurden mit BSA 5% ohne Zusatz von Tween20 vorher blockiert. Die Zugabe von Tween20 unabhängig der verwendeten Konzentration führte zu einer Steigerung des Signals in beschichteten Wells (vergleiche linkes Säulenpaar mit den mittleren vier Säulenpaaren). Die alleinige Verwendung von Tween20 ohne BSA ließ das Signal in beschichteten Wells gleichbleibend hoch bei fehlender Blockierung von unspezifischer Plattenbindung in unbeschichteten Wells (rechtes Säulenpaar) und führte zu einer Abnahme des spezifischen Signals (Differenzsignal zwischen beschichteten und unbeschichteten Wells). Mittelwerte ($n=3$) \pm Standardabweichung.

Aus den durchgeführten Tests ergab sich BSA 5% in PBS als Blockierungspuffer und unter Zusatz von Tween20 0,1% als Verdünnungspuffer als die potenteste Kombination zur Reduktion unspezifischer Serumaktivität. In der weiteren Etablierung wurde diese Kombination verwendet.

6.2.4 Vergleich unterschiedlicher ELISA Platten

Es wurden insgesamt fünf Platten von drei verschiedenen Herstellern hinsichtlich ihrer Bindungskapazität bezüglich α -Synuclein und der unspezifischer Hintergrundaktivität des Serums untersucht. Als relatives Vergleichsmaß wurde wieder der Anteil des Signals aus unbeschichteten Wells am Signal aus beschichteten Wells verwendet (Abb. 12). Dabei wurden eine Platte mit sogenannten *medium bind* Eigenschaften und vier Platten mit *high bind* Eigenschaften, sowie mit unterschiedlichen Wellböden (u-förmig gegenüber flachen Boden) verglichen.

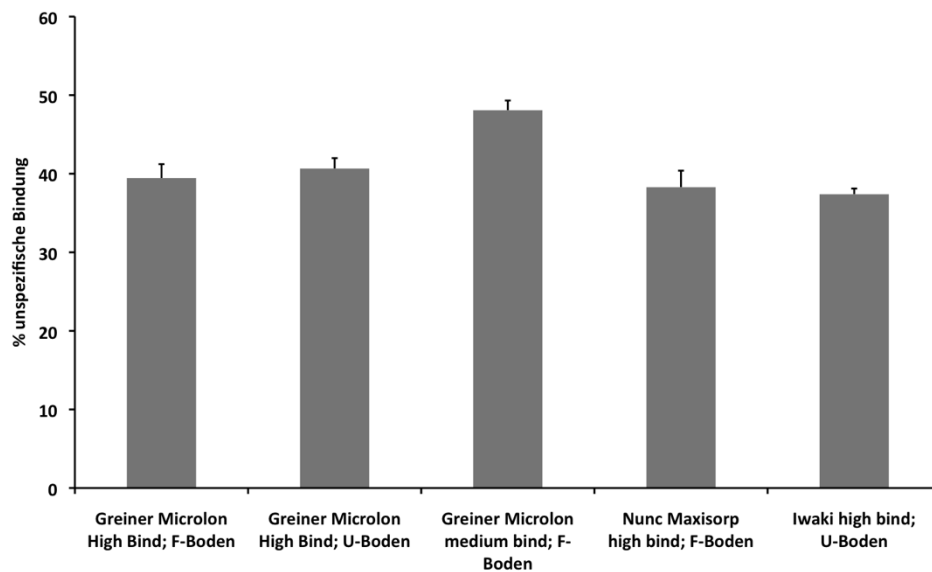


Abb. 12: Vergleich unterschiedlicher ELISA Platten. Die getesteten *high bind* Platten unterschieden sich nicht bezüglich der unspezifischen Bindung. Im Fall der *medium bind* Platte war wegen der veränderten Oberflächenbeschaffenheit der Wells im Vergleich zu *high bind* Platten von einer verminderten Beschichtung mit α -Synuclein auszugehen. Mittelwerte ($n=3$) \pm Standardabweichung.

Auf Grund der höheren Bindungsaffinität für α -Synuclein wurde weiterhin eine ELISA Platte mit *high bind* Eigenschaften verwendet. Wegen der schon begonnen Puffertestung mit IWAKI Platten wurde der Plattentyp beibehalten.

6.2.5 Vergleich unterschiedlicher α -Synucleinbeschichtungen

Im nächsten Schritt wurden auf einer IWAKI Elisa Platte zur Bestimmung einer optimalen α -Synucleinbeschichtung unterschiedliche α -Synucleinkonzentrationen aufsteigend von 0,5 μ g/ml bis 10 μ g/ml sowie eine Leermessung von 0 μ g/ml aufgetragen. Als relatives Vergleichsmaß zur Beurteilung des Effekts der untersuchten Konzentrationen wurde wieder der prozentuale Anteil der unspezifischen Bindung herangezogen (Abb. 13).

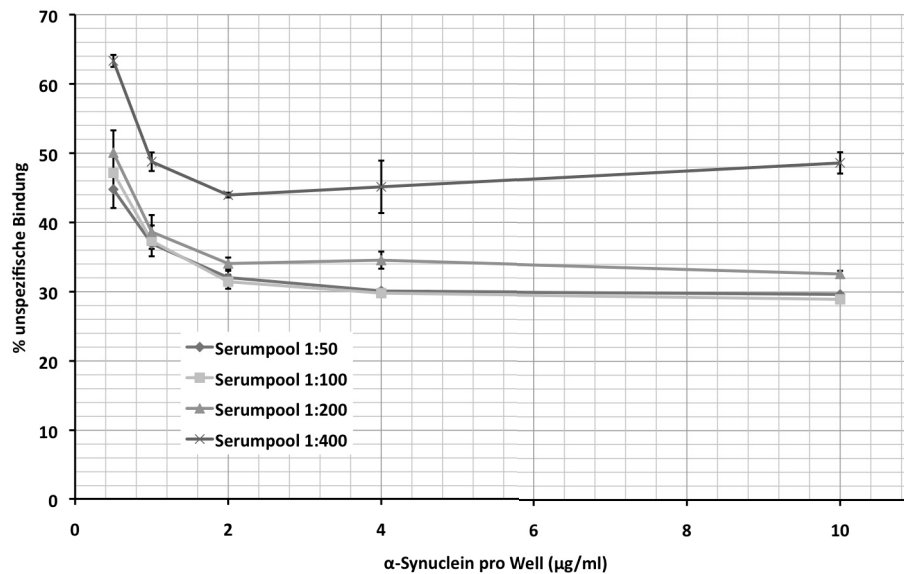


Abb. 13: Vergleich unterschiedlicher Konzentrationen der α -Synucleinbeschichtung. In aufsteigender Konzentration (0,5 µg/ml bis 10 µg/ml) wurden Platten mit α -Synuclein beschichtet. Es erfolgte die Inkubation mit dem Serumpool in unterschiedlichen Verdünnungen. Ab einer Konzentration von 2 µg/ml ließ sich kein signalsteigernder Effekt aus den beschichteten Wells erzielen, d.h. der Anteil der unspezifischen Bindung blieb konstant. In den höher verdünnten Proben (deutlich bei 1:400) war der Anteil der unspezifischen Bindung höher. Dies ging auf die Tatsache zurück, dass mit steigender Verdünnung das Signal aus beschichteten Wells stärker abnahm, als das Signal aus unbeschichteten Wells. Im Falle der 1:400 Verdünnung zeichnete sich bei höherer α -Synucleinkonzentration ein erneuter Anstieg der unspezifischen Bindung ab. Durch die hohe Verdünnung waren wahrscheinlich schon alle Autoantikörper an α -Synuclein gebunden, so dass noch „freies“ beschichtetes α -Synuclein die unspezifische Bindung von Serum IgG an die Plastikoberfläche der Platte inhibierte. Mittelwerte ($n=3$) \pm Standardabweichung.

Um sicher im horizontal verlaufendem Bereich der Kurve zu liegen, wurde im weiteren Versuchsaufbau die α -Synucleinkonzentration zur Plattenbeschichtung von initial 2 µg/ml auf 3 µg/ml erhöht.

6.2.6 Vergleich verschiedener Sekundärantikörperverdünnungen

Der kommerziell erhältliche *anti-human* IgG Sekundärantikörper wurde nach Angaben des Herstellers in der für ELISA optimalen Verdünnung zwischen 1:5000 und 1:10000 hinsichtlich seines Anteils an der unspezifischen Bindung getestet (Abb. 14). Zur Abdeckung eines größeren Bereichs wurde zusätzlich eine 1:4000 Verdünnung verwendet. Ab einer Verdünnung von 1:5000 zeigte der Sekundärantikörper keinen Unterschied mehr hinsichtlich des unspezifischen Signals. Lediglich führte eine höhere

Verdünnung zu einer Abnahme des absoluten Absorptionssignals, so dass im weiteren Verlauf eine Verdünnung von 1:5000 verwendet wurde.

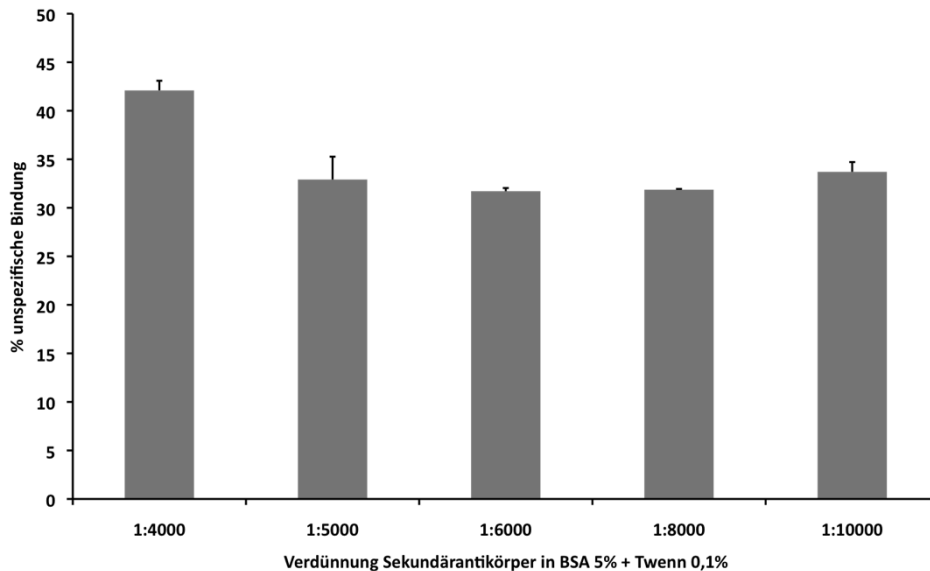


Abb. 14: Vergleich verschiedener Verdünnungen des Sekundärantikörpers. Nach Angaben des Herstellers liegt die optimale Verdünnung des Sekundärantikörpers für ELISA Anwendungen zwischen 1:5.000 bis 1:10.000. Zur Abdeckung eines weiteren Bereichs wurde zusätzlich eine 1:4.000 Verdünnung getestet. Hier zeigten sich bereits unspezifische Wechselwirkungen des Sekundärantikörpers, die Einfluss auf das spezifische bzw. unspezifische Signal nahmen. Verdünnungen jenseits der 1:10.000 Marke wurden nicht getestet. Ein erneuter Anstieg der unspezifischen Bindung wäre auch hier zu erwarten gewesen. Mittelwerte ($n=3$) \pm Standardabweichung.

6.2.7 Konsequenzen aus den Ergebnissen der Etablierung Schritt I

Durch die bisherigen Ergebnisse konnte das Ausgangsprotokoll erheblich modifiziert werden. Das durchgehende Ziel der bisherigen Arbeit war die Reduktion der unspezifischen Hintergrundaktivität des Serums auf Grund der Adsorption humaner IgG an die Plastikoberfläche der ELISA Platte. Durch Anwendung verschiedener Blockierungslösungen unter Zusatz von BSA und Tween20, Testung verschiedener ELISA Platten, α -Synuclein- und Sekundärantikörperkonzentrationen konnte die unspezifische Bindung bei Verwendung eines Serumpools auf ca. 30% des Signals aus α -Synuclein Wells reduziert werden. Bei der Messung einzelner individueller Serumproben ($n=24$) zeigte sich jedoch ein großer Streubereich des Anteils der unspezifischen Bindung von minimal 11% bis maximal 90% bei einem arithmetischen Mittel von 26%. In einem Fall übertraf sogar das Absorptionssignal in unbeschichteten Wells das Signal in α -Synuclein Wells (Abb. 15).

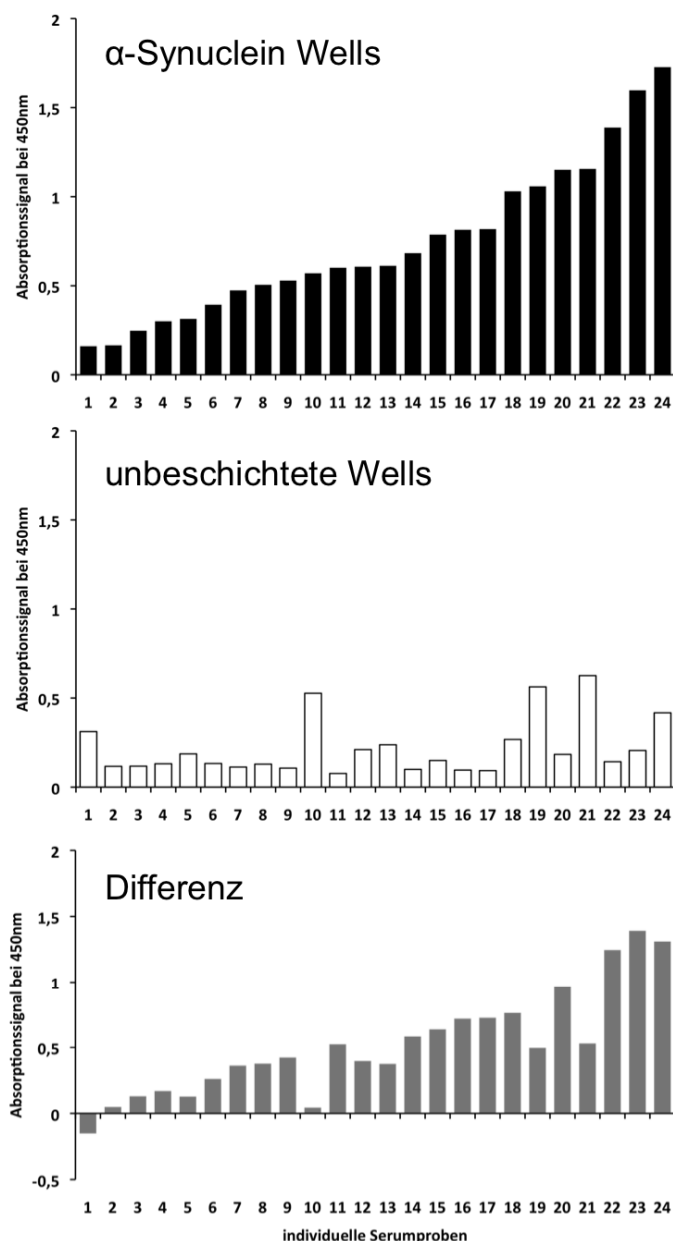


Abb. 15: Parallele Messung des Absorptionssignals von individuellen Parkinson Serumproben (n=24) in α-Synuclein und unbeschichteten Wells. Das obere Diagramm zeigt die gemessenen Absorptionswerte in α-Synuclein Wells in aufsteigender Reihenfolge. Das mittlere Diagramm zeigt das Bindungsverhalten derselben Serumproben in unbeschichteten Wells und das untere Diagramm bildet die Differenz zwischen beiden Werten ab. Die Stärke der unspezifischen Aktivität des Serums wies große interindividuelle Unterschiede auf und korrelierte nicht mit dem Signal aus α-Synuclein Wells. Nach Bildung der Differenz blieb die ursprünglich aufsteigende Anordnung der Proben tendenziell erhalten. Einige Proben wiesen aber nach Berücksichtigung der unspezifischen Aktivität eine erhebliche Signalreduktion auf. Proben 2 und 10 wurden soweit reduziert, dass sie sich nicht mehr sicher von der Messung des Leerwerts unterscheiden ließen. Bei Probe 1 übertraf das Signal in unbeschichteten Wells das Signal in α-Synuclein Wells. Die Proben 19 und 21 zeigten eindrücklich, dass sich das Signal unter Berücksichtigung der unspezifischen Serumaktivität um fast 50% reduzierte. Unter Voraussetzung eines linearen Zusammenhangs zwischen Absorption und Konzentration, reduzierte sich damit ebenfalls die Menge des nachweisbaren Autoantikörpers.

Auf den Anteil unspezifischer Serumaktivität am Gesamtsignal aus α -Synuclein Wells konnte durch Messung des Serumsignals in unbeschichteten Wells strenggenommen nur indirekt geschlossen werden. Der Anteil konnte aber erhebliche Ausmaße annehmen – sogar das Signal der natürlichen Autoantikörper übertreffen – und durfte daher nicht ignoriert werden. Zu Gunsten der analytischen Spezifität und zu Lasten der analytischen Sensitivität des Assays wurde im weiteren Verlauf bei der Messung jeder Serumprobe das Absorptionssignal aus unbeschichteten Wells mitbestimmt. Nur die Differenz zwischen der Absorption aus beschichteten zu unbeschichteten Wells konnte als alleiniger Effekt durch Bindung von Antikörpern an α -Synuclein betrachtet werden und wurde daher für die weitere Berechnung der Konzentration verwendet. Eine Über- oder Unterschätzung der Konzentration des natürlich vorkommenden Autoantikörpers konnte somit am ehesten vermieden werden.

6.3 Etablierung des α -Synuclein Autoantikörper ELISAs für Serum – Schritt II: Validierung

6.3.1 Bindungsspezifität des IVIg- und Serumautoantikörpers im ELISA

Nach initialer Kontrolle im Western Blot erfolgte die Charakterisierung der Bindungsspezifität des affinitätsgereinigten IVIg Autoantikörpers und des Autoantikörpers im Serum mittels ELISA. Hierzu wurde eine ELISA Platte mit α -Synuclein, β -Synuclein, humanem Serum Albumin (HSA) und BSA in der gleichen Stoffmenge (ausgehend von $3\mu\text{g/ml}$ α -Synuclein) beschichtet. Als Positivkontrolle wurde wieder der monoklonale Antikörperklon Syn211 (mAb211) verwendet (Abb. 16).

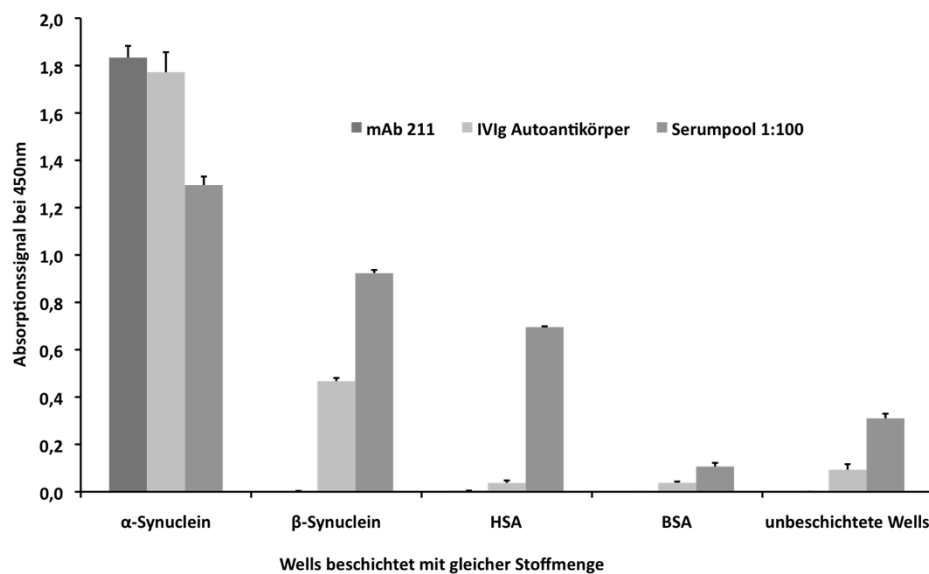


Abb. 16: Bindungsspezifität des affinitätsgereinigten IVIg Autoantikörpers und Serumpools im ELISA. Die Wells wurden mit äquivalenten Stoffmengen beschichtet. Der monoklonale Antikörper Syn211 (mAb 211) diente als Positivkontrolle. Er zeigte keine Kreuzreaktivität mit den beschichteten Kontrollproteinen. Der affinitätsgereinigte Autoantikörper band nicht an HSA und BSA, erkannte allerdings β -Synuclein. Serumpool blieb nach Abzug des Signals aus unbeschichteten Wells positiv für α -Synuclein, β -Synuclein und humanem Serumalbumin (HSA). Mittelwerte ($n=3$) \pm Standardabweichung.

Der monoklonale Antikörper erkannte spezifisch α -Synuclein und wies keine unspezifische Bindung an die Platte auf. Der affinitätsgereinigte Autoantikörper zeigte keine Kreuzreaktivität mit den verwendeten Kontrollproteinen mit Ausnahme von β -Synuclein. α -Synuclein und β -Synuclein weisen zu 61% eine identische Aminosäuresequenz (Jakes et al. 1994; Lavedan 1998) auf, was die zusätzliche Bindung des Autoantikörpers erklärt und im Western-Blot ebenfalls nachgewiesen wurde (unveröffentlichte Daten). Im Gegensatz zum Serum zeigte der aufgereinigte IVIg Autoantikörper nur ein vernachlässigbar geringes Potential an die unbeschichtete Platte zu binden. Der gereinigte IVIg Autoantikörper wurde in der weiteren Etablierung als Standard und Referenz zur Bestimmung der Konzentration des natürlichen Autoantikörpers gegen α -Synuclein im Serum verwendet. Der Serumpool zeigte in α -Synuclein Wells das größte Absorptionssignal. Abzüglich der unspezifischen Bindung aus unbeschichteten Wells verblieb ein spezifisches Signal in β -Synuclein und HSA beschichteten Wells. Für beide Proteine sind Autoantikörper im Serum zuvor nachgewiesen worden (Avrameas 1991; Papachroni et al. 2007). Eine Antikörperreaktivität

des Serumpools gegen BSA lies sich nicht zeigen. Hier ergab sich eine negative Differenz unter Berücksichtigung der unspezifischen Bindung.

6.3.2 Linearitätsprüfung des Standards und Bestimmung der unteren Nachweisgrenze

Unter Linearität einer analytischen Methode versteht man die Eigenschaft eines Assays über einen bestimmten Bereich Messergebnisse zu erhalten, die sich direkt proportional zur Konzentration des Analyten verhalten (FDA 2009). Zur Herstellung der Standardkurve wurde der affinitätsgereinigte IVIg Autoantikörper seriell 1:2 verdünnt. In der Verdünnungsreihe von 1:500 bis 1:64000 zeigte der Autoantikörper eine spezifische lineare Abnahme ($r^2=0,9938$; Abb. 17). Dieser Bereich entsprach einer Autoantikörperkonzentration von 6,5µg/ml bis 0,10µg/ml. Die Konzentration wurde bestimmt, indem die Konzentration der Stocklösung des aufgereinigten und aufkonzentrierten IVIg Autoantikörpers, die mittels NanoDrop gemessen wurde, durch den Verdünnungsfaktor dividiert wurde.

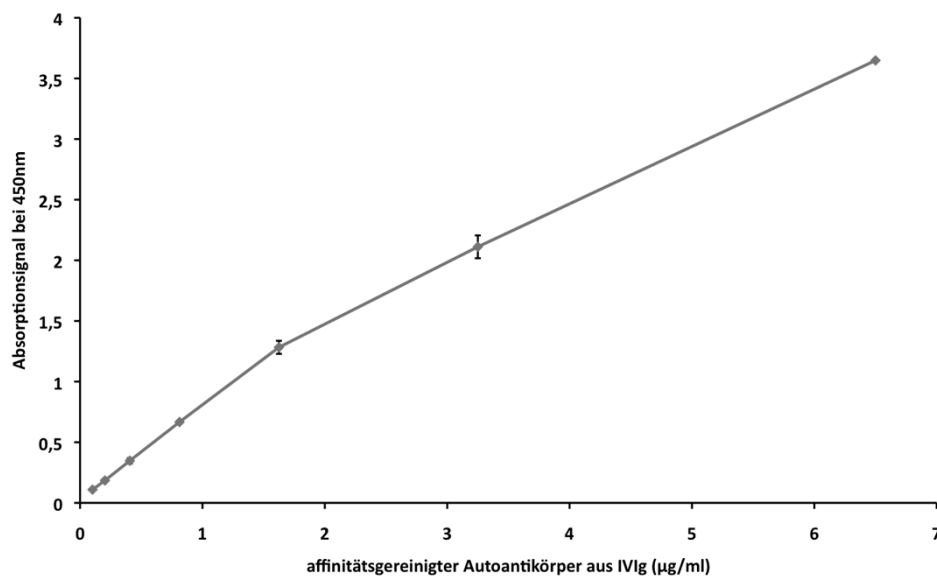


Abb. 17: Repräsentative Standardkurve des α -Synuclein Autoantikörper ELISAs. Im Bereich zwischen 6,5µg/ml bis 0,10µg/ml zeigte sich eine lineare Abnahme ($r^2=0,9938$). Punkte sind Mittelwerte ($n=3$) \pm Standardabweichung.

Die analytische Sensitivität eines Assays wird durch die Berechnung der unteren Nachweisgrenze (*lower detection limit*) bestimmt. Die untere Nachweisgrenze gibt die niedrigste messbare Konzentration an, die sich mit einer gewissen statistischen Sicherheit vom Leerwert unterscheiden lässt. Sie wird aus dem Mittelwert des Leerwerts (bei $n=20$ Messungen) plus der dreifachen Standardabweichung berechnet (Luttmann et al. 2009). Für den Assay ergab sich ein Wert von 0,088µg/ml als untere Bestimmungsgrenze, bei der mit einer ausreichenden statistischen Sicherheit ein Antikörpernachweis erfolgen konnte.

6.3.3 Messgenauigkeit: *Spike-Recovery-Test* und Verdünnungslinearität

Spike-Recovery-Tests und Prüfung der Verdünnungslinearität sind in der Bioanalytik wichtige Methoden zur Validierung der Messgenauigkeit (engl. *accuracy*) eines Assays (Betz et al. 2011). Unter Genauigkeit einer analytischen Methode wird dabei das Ausmaß der Übereinstimmung zwischen dem wahren oder Erwartungswert (auch Sollwert) der Analytenkonzentration und dem durch die analytische Methode gemessenen Wert verstanden (Thomas 2007). Die Annäherung an den wahren Wert kann als sogenannte *Recovery* (Wiederfindung) in Prozent ausgedrückt werden (FDA 2009). Beim *Spike-Recovery* wird eine bekannte Menge des Analyten (*Spike*) in der Probenmatrix (z.B. Serum) mit ebenfalls bekannter Analytenkonzentration gelöst. Das

dabei gemessene Signal wird mit Hilfe einer Standardkurve in einen Mengen oder Konzentrationswert umgerechnet und mit dem Erwartungswert verglichen. Eine 100%ige *Recovery* wäre bei identischen Konzentrationen des Erwartungs- und Messwertes erreicht. Abweichungen von den 100% geben damit Rückschlüsse auf den Einfluss systematischer Fehler, wie z.B. von Matrixeffekten, auf die akkurate Probenmessung (Bergmeyer 1983). Im vorliegenden Assay wurden bekannte Mengen des affinitätsgereinigten IVIg Autoantikörpers in das gleiche Volumen einer Serumpoolverdünnung (1:100 und 1:400) und reinem Verdünnungspuffer gelöst. Es wurde die Absorption der Serumpoolverdünnung mit und ohne Antikörperzusatz (AK-Zusatz entspricht *Spike*) und des Verdünnungspuffers mit Antikörperzusatz (AK-Zusatz pur) gemessen. Die Absorptionswerte wurden mittels Standardkurve in µg/ml Konzentration umgerechnet und mit den wahren Konzentrationen (Sollwerte) verglichen. Die Sollkonzentrationen ergeben sich aus der Addition der Werte der Serumverdünnungen ohne externen Zusatz des Autoantikörpers und des affinitätsgereinigten Autoantikörpers in Verdünnungspuffer (AK-Zusatz pur). Die *Recovery* Raten wurden dabei wie folgt berechnet:

$$\frac{\text{Konz. (Serumverdünnung mit AK -Zusatz)}}{\text{Konz. (Serumverdünnung ohne Ak -Zusatz) + Konz. (AK -Zusatz pur)}} \times 100\%$$

Die mittlere *Recovery* Rate (Abb. 18) lag bei 91% (1:100 Verdünnung) und 96% (1:400 Verdünnung) und blieb damit sicher innerhalb des gewünschten Bereichs von 80 bis 120% (FDA 2009; Findlay et al. 2000). Damit konnte ausgeschlossen werden, dass möglicherweise freies endogen vorhandenes α-Synuclein im Serum den Autoantikörper daran hindert an das immobilisierte rekombinante α-Synuclein zu binden, da hierbei eine erhebliche Abweichung der *Recovery* Rate zu erwarten gewesen wäre.

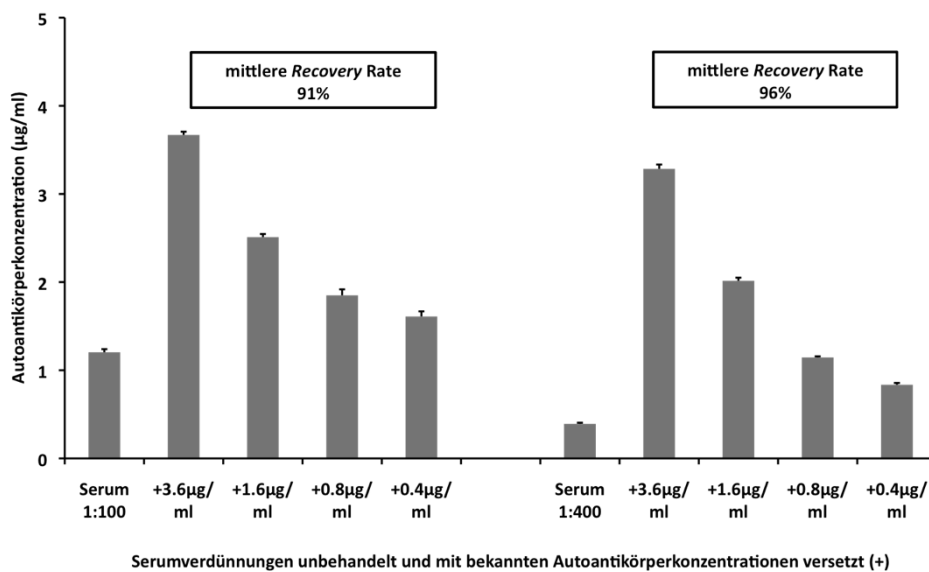


Abb. 18: Spike-Recovery α -Synuclein Autoantikörper Serum ELISA. Serumpool (1:100 und 1:400) wurde mit jeweils vier bekannten Konzentrationen des affinitätsgereinigten Autoantikörpers versetzt (*Spikes*). Die mittlere *Recovery* Raten waren 91% (1:100) und 96% (1:400). Mittelwerte ($n=3$) \pm Standardabweichung.

Bei der Prüfung der Verdünnungslinearität wird die Genauigkeit des Assays bei Messung von Proben in verschiedenen Verdünnungsstufen bestimmt (Findlay et al. 2000). Linearität ist in diesem Fall relativ zu der berechneten Menge des Analyten basierend auf der Standardkurve und nicht relativ zu den rohen Absorptionswerten definiert. Ist die Linearität über einen weiten Verdünnungsbereich gut, besitzt der Assay eine ausreichende Flexibilität Proben mit unterschiedlichen Analytenmengen sicher zu messen. Zu diesem Zweck wurden zwei individuelle Serumproben, die in vorausgehenden Versuchen eine überdurchschnittliche hohe bzw. niedrige Konzentration des Autoantikörpers aufwiesen, über einen weiten Bereich, von unverdünnt bis 1:4800, seriell verdünnt. Dabei zeigten beide Proben eine gemeinsame überlappende lineare Abnahme zwischen der 1:50 bis 1:600 Verdünnung (Abb. 19). Die innere Konsistenz der Verdünnungslinearität wurde durch die Relation der errechneten Konzentration der jeweiligen Verdünnungsstufe mit der erwarteten Konzentration, ausgehend von der 1:50 Verdünnung, geprüft und ebenfalls als *Recovery* in Prozent angeben (Tab. 2)

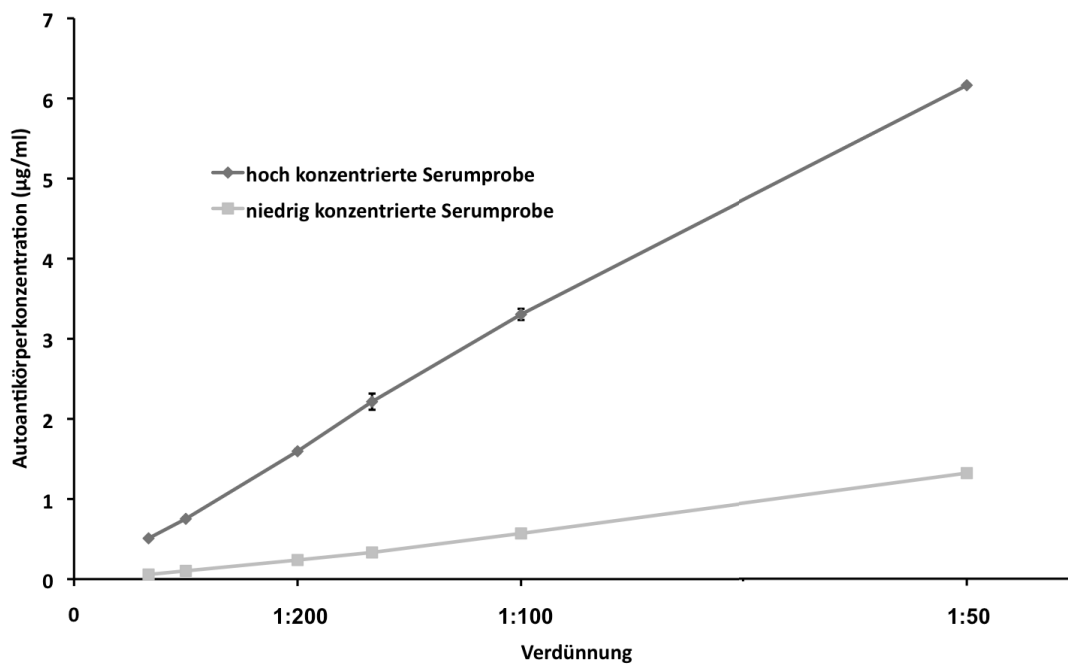


Abb. 19: Linearitätsnachweis zweier individueller Serumproben. Die verwendeten Serumproben zeigten eine überlappende lineare Abnahme ($r^2=0,9975$ und $r^2=0,9956$) im Verdünnungsbereich von 1:50 bis 1:600. Punkte sind Mittelwerte ($n=3$) \pm Standardabweichung.

Probe	Verdünnung	gemessene Konzentration (µg/ml)	erwartete Konzentration (µg/ml)	Recovery%
hochkonzentrierte Serumprobe	1:50	308,2	308,2	100
	1:100	330,5	308,2	107
	1:150	332,2	308,2	108
	1:200	319,2	308,2	104
	1:400	301,0	308,2	98
	1:600	305,4	308,2	99
niedrigkonzentrierte Serumprobe	1:50	66,0	66,0	100
	1:100	59,0	66,0	89
	1:150	59,9	66,0	91
	1:200	57,7	66,0	87
	1:400	51,2	66,0	78
	1:600	50,5	66,0	77

Tab. 2: Nachweis der Verdünnungslinearität des Autoantikörper ELISAs an Hand zweier individueller Serumproben.

Der lineare Messbereich weist auf eine akkurate Messmethode hin und die gemessenen Konzentrationen liegen innerhalb des Standardkurvenbereichs. Die

Recovery-Werte zeigten einen leichten Verlust der Sicherheit in der Bestimmung niedriger Konzentrationen (Tab. 2). Hier befanden sich die letzten Verdünnungen außerhalb des akzeptablen Fehlerbereichs von <20% der Genauigkeit (Findlay et al. 2000). Die untere Grenze der Verdünnungslinearität wird definitiv durch die untere Nachweisgrenze (s.o.) bestimmt. Im Rahmen der nachfolgenden parallelen Messung mehrerer individueller Serumproben wurde eine einheitliche Verdünnung von 1:100 festgelegt, da bei dieser Verdünnung das Signal sowohl im sicheren linearen Abnahmebereich als auch innerhalb der Standardkurve lag.

6.3.4 Intra- und Inter-Assay Präzision

Die Präzision eines Assays beschreibt die gegenseitige Annäherung voneinander unabhängiger Messergebnisse bei mehrfacher Anwendung der Methode (Thomas 2007). Unter Intra-Assay Präzision versteht man die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse bei mehrfacher Messung mehrerer individueller Proben innerhalb einer Versuchsdurchführung. Bei der Bestimmung der Inter-Assay Präzision werden dagegen die gleichen Proben in mehreren zeitlich hintereinander geschalteten Versuchsdurchführungen (von Tag zu Tag) gemessen. Im Idealfall sollten die gemessenen Werte sich sowohl innerhalb des Versuches als auch zwischen mehreren Versuchen minimal unterscheiden. Als relatives Maß der Streuung der gemessenen Werte – eigentlich die Unpräzision der Methode – wird der Variationskoeffizient (VK) angegeben (Bergmeyer 1983). Dieser gibt den Anteil der Standardabweichung der Messwerte am gemessenen Mittelwert wieder und wird in Prozent ausgedrückt:

$$VK = \frac{\sigma}{X} \times 100\%$$

mit σ : Standardabweichung; X: arithmetischer Mittelwert der Messungen

Intra-Assay VK										
Serumproben (1:100)	1	2	3	4	5	6	7	8	9	
Well 1	1,70	1,90	4,46	2,53	1,88	2,60	0,65	2,65	1,73	µg/ml
Well 2	1,67	1,85	4,30	2,37	1,88	2,60	0,62	3,03	1,79	µg/ml
Well 3	1,79	1,76	4,33	2,38	1,81	2,3	0,63	2,56	1,80	µg/ml
Well 4	1,72	1,86	4,26	2,46	1,95	2,42	0,62	2,72	1,92	µg/ml
Well 5	1,68	1,71	4,28	2,31	1,82	2,45	0,65	2,64	2,02	µg/ml
Well 6	1,57	1,66	4,26	2,46	1,79	2,46	0,63	2,85	1,91	µg/ml
Well 7	1,58	1,66	4,33	2,35	1,81	2,58	0,62	2,74	1,82	µg/ml
Well 8	1,67	1,78	4,34	2,46	1,87	2,59	0,64	2,72	1,82	µg/ml
Mittelwert	1,67	1,77	4,32	2,41	1,85	2,51	0,63	2,74	1,85	µg/ml
Standardabweichung	0,07	0,09	0,06	0,07	0,05	0,09	0,01	0,14	0,09	µg/ml
Intra-Assay VK	4,3	5,3	1,5	3	2,9	3,7	2,2	5,3	5	%
Mittlerer Intra-Assay VK									3,7	%

Intra-Assay VK										
Serumproben (1:100)	1	2	3	4	5	6	7	8	9	
Tag 1	1,68	1,59	4,45	2,61	1,64	2,37	0,59	2,19	2,40	µg/ml
Tag 2	1,65	1,86	4,54	2,73	1,78	2,71	0,70	2,19	2,94	µg/ml
Tag 3	1,64	1,96	4,29	2,81	1,81	2,43	0,65	3,08	1,98	µg/ml
Tag 4	1,67	1,77	4,32	2,42	1,85	2,51	0,63	2,74	1,85	µg/ml
Tag 5	1,47	1,61	4,50	2,94	1,84	2,63	0,78	2,92	2,26	µg/ml
Mittelwert	1,62	1,76	4,42	2,70	1,78	2,53	0,67	2,62	2,29	µg/ml
Standardabweichung	0,08	0,15	0,11	0,19	0,08	0,14	0,07	0,41	0,42	µg/ml
Inter-Assay VK	5,4	9	2,5	7,4	4,7	5,5	10,6	15,8	18,5	%
Mittlere Inter-Assay VK									8,8	%

Tab. 3: Intra- und Inter-Assay Variationskoeffizient (VK) für den α -Synuclein Autoantikörper Serum ELISA

Der Variationskoeffizient eines Immuno-Assays sollte dabei nicht größer 20% werden (Braggio et al. 1996; Findlay et al. 2000). In der vorliegenden Arbeit wurde der Intra-Assay VK durch wiederholte Messung neun verschiedener Serumproben (1:100 verdünnt) in jeweils acht Wells innerhalb einer Platte ermittelt. Die Bestimmung des Inter-Assay VC erfolgte durch Messung der neun Proben an fünf aufeinanderfolgenden Tagen. Tab. 3 gibt die einzelnen Messwerte an. Der Intra- und Interassay VK ergab dabei Werte von 3,7% und 8,8% und lag damit im geforderten Rahmen unter 20%.

6.4 Etablierung des α -Synuclein ELISAs für Serum – Schritt I: Aufbau

Zur Etablierung des ELISAs zur Detektion und Quantifikation von freiem α -Synuclein im Serum wurde ein Protokoll basierend auf der Veröffentlichung von Tinsely und Kollegen (2010) herangezogen.

Zur Überprüfung der Reproduzierbarkeit der berichteten Daten von Tinsely et al. (2010) wurden unterschiedliche Konzentrationen des empfohlenen Fänger- (MCA 2A7) und Detektionsantikörpers (FL-140) an Hand eines Schachbrettmusters auf die ELISA Platte aufgetragen. Als Gütekriterium diente dabei der *signal:noise* Quotient zur Bestimmung der optimalen Konzentration der beiden Antikörper. Beim *signal:noise* Quotient wurden die Absorptionswerte aus Wells, die standardmäßig mit 250ng/ml rekombinantem α -Synuclein oder einer 1:3 Serumpoolverdünnung inkubiert wurden (*signal*), durch die Absorptionswerte, die sich aus nur mit Verdünnungspuffer (PBS) befüllten Wells ergaben (*noise*), dividiert. Ein maximaler *signal:noise* Quotient stellte die optimale Kombination der Antikörperkonzentrationen dar (Abb. 20).

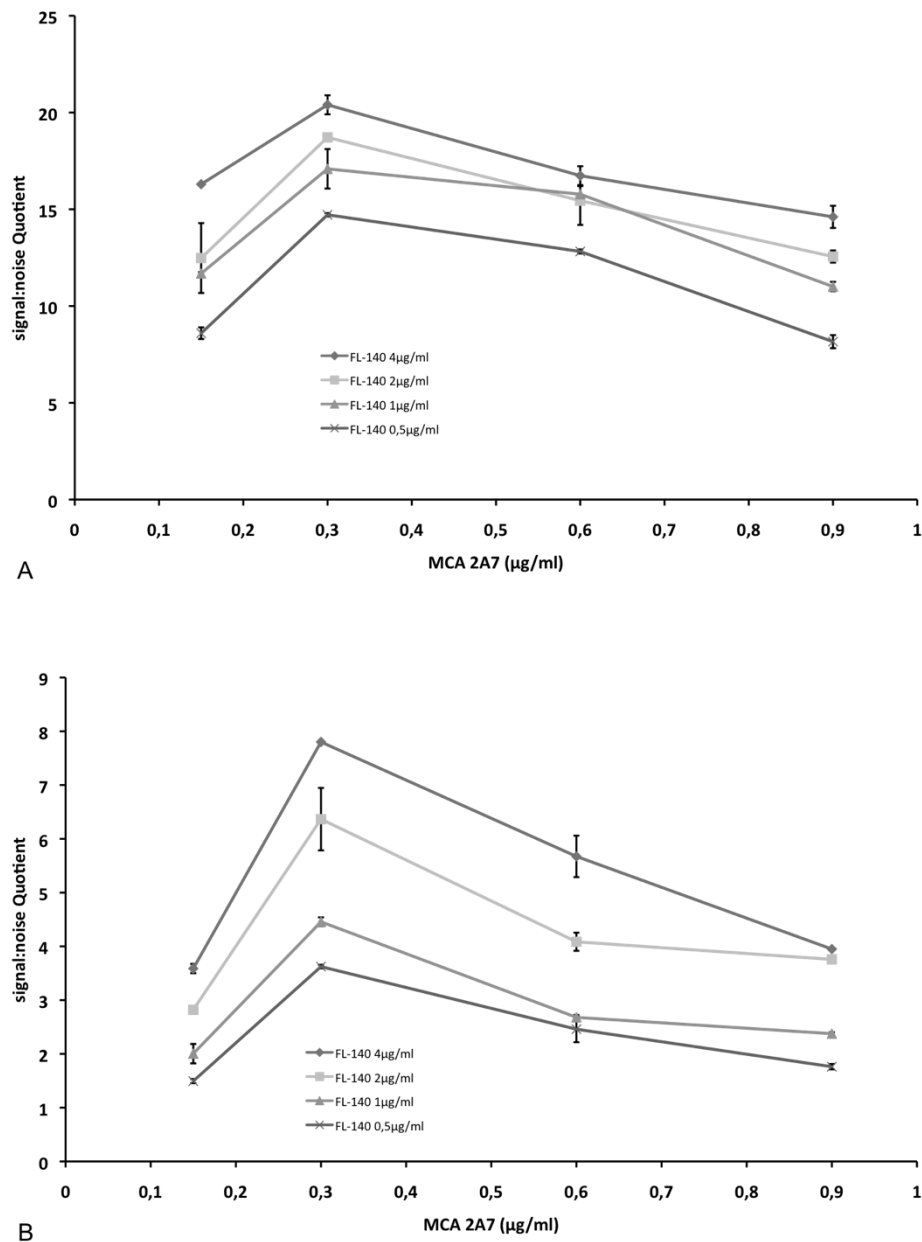


Abb. 20: Schachbrettmessung zur Optimierung des *signal:noise* Quotienten. Der *signal:noise* Quotient wurde bei verschiedenen Konzentrationen des Fängerantikörpers (MCA 2A7) und des Detektionsantikörpers (FL-140) gemessen. **A:** mit 250ng/ml rekombinantem α -Synuclein. **B:** mit einer 1:3 Serumpoolverdünnung. Punkte sind Mittelwerte ($n=3$) \pm Standardabweichung.

Korrespondierend zu den Ergebnisse von Tinsley et al. (2010) ergab sich ein optimales *signal:noise* Verhältnis bei einer Konzentration des Fängerantikörpers MCA 2A7 von 0,3 $\mu\text{g/ml}$ und des Detektionsantikörpers FL-140 von 4 $\mu\text{g/ml}$.

Auf eine weitere Austestung der Parameter des Protokolls von Tinsely et al. (2010) wurde daher im Anschluss verzichtet.

6.5 Etablierung des α -Synuclein ELISAs für Serum – Schritt II:

Validierung

6.5.1 Linearitätsprüfung des Standards und Bestimmung der unteren Nachweisgrenze

Eine Standardkurve wurde durch serielle Verdünnung von rekombinantem α -Synuclein von 150ng/ml bis 0.4ng/ml erstellt. Dabei zeigte sich eine lineare Abnahme ($r^2=0,9914$) zwischen 50ng/ml und 1,56ng/ml α -Synuclein (Abb. 21). Die untere Nachweisgrenze (zur Bestimmung siehe Kapitel 6.3.2) lag bei 1ng/ml α -Synuclein. Dies entspricht den von Tinsley et al. (2010) berichteten Angaben.

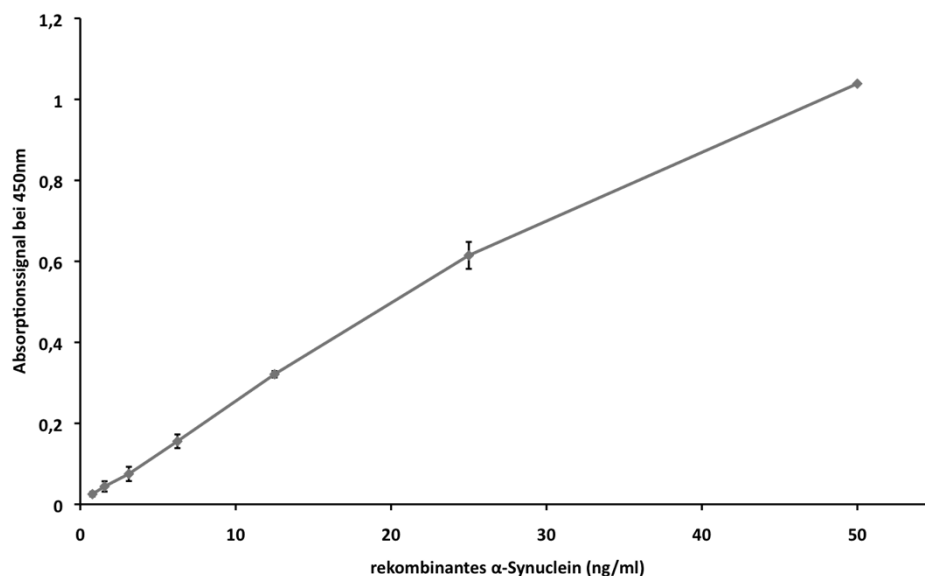


Abb. 21: Repräsentative Standardkurve des α -Synuclein ELISAs. Im Bereich zwischen 50ng/ml bis 1,56ng/ml zeigte sich eine lineare Abnahme ($r^2=0,9914$). Punkte sind Mittelwerte ($n=3$) \pm Standardabweichung.

6.5.2 Messgenauigkeit: *Spike-Recovery-Test* und Verdünnungslinearität

Ein analytischer *Spike-Recovery* Test wurde mit zwei Serumverdünnungen (1:2 und 1:4) durchgeführt, die mit drei verschiedenen Konzentrationen rekombinantem α -Synuclein zugesetzt wurden (Spikes). In initialen Testläufen zeigte sich im Gegensatz zum Protokoll von Tinsely et al. eine bessere *Recovery* von eingesetztem α -Synuclein bei Verdünnung der Serumprobe in reinem PBS ohne Zusatz von Tween20 oder BSA. Als mittlere *Recovery* Raten (Abb. 22) ergaben sich 87% (1:2) und 92% (1:4).

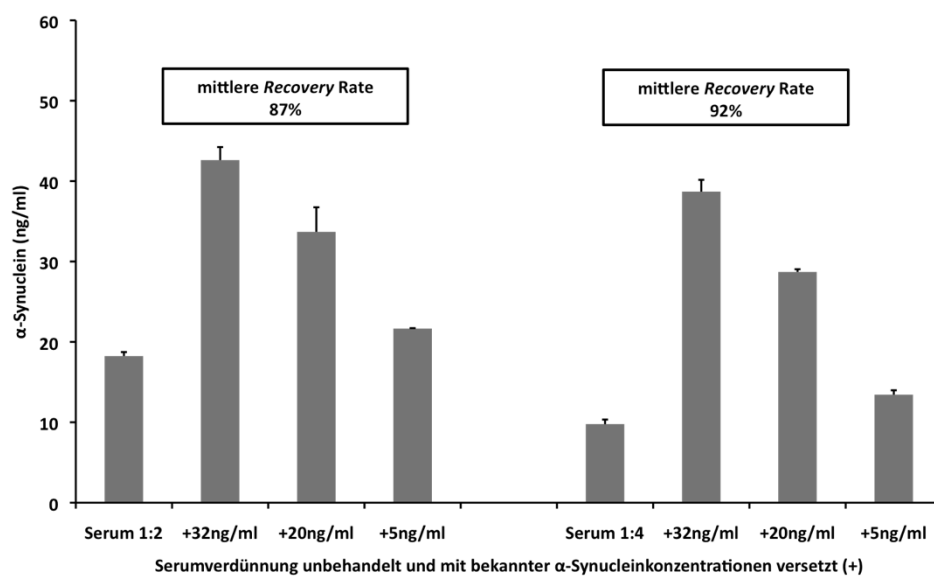


Abb. 22: *Spike-Recovery* α -Synuclein Serum ELISA. Serumpool (1:2 und 1:4) wurde mit jeweils drei bekannten Konzentrationen des rekombinanten α -Synucleins versetzt (*Spikes*). Die mittlere *Recovery* Raten waren 87% (1:2) und 92% (1:4). Mittelwerte ($n=3$) \pm Standardabweichung.

Die Verdünnungslinearität des Assays wurde unter Verwendung zweier unterschiedlicher individueller Serumproben mit jeweils hoher und niedriger endogener α -Synucleinkonzentration für einen Verdünnungsbereich zwischen 1:2 bis 1:16 nachgewiesen (Abb. 23). Die *Recovery* der Linearität lag für beide Proben zwischen 91 und 116% (Tab. 4). Somit lagen beide Verfahren zur Quantifizierung der Genauigkeit im geforderten Akzeptanzbereichs für Immuno-Assays von 80-120% (FDA 2009; Findlay et al. 2000). Zur parallelen Messung mehrerer individueller Serumproben

wurde standardmäßig im weiteren Verlauf der Arbeit eine Verdünnung von 1:3 verwendet.

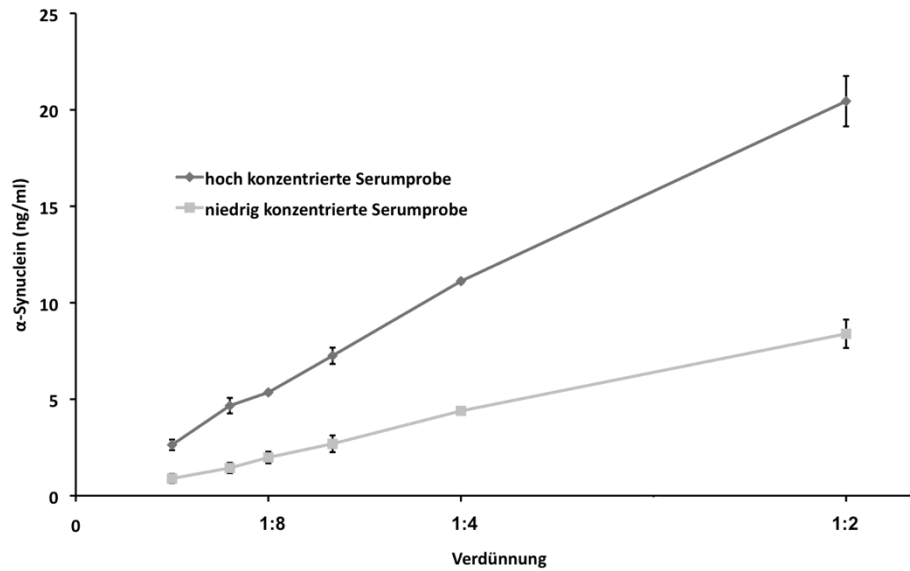


Abb. 23: Linearitätsnachweis zweier individueller Serumproben. Die verwendeten Serumproben zeigten eine überlappende lineare Abnahme ($r^2=0,9942$ und $r^2=0,9979$) in einem Verdünnungsbereich von 1:2 bis 1:16. Punkte sind Mittelwerte ($n=3$) \pm Standardabweichung.

Probe	Verdünnung	gemessene Konzentration (ng/ml)	erwartete Konzentration (ng/ml)	Recovery%
hoch konzentrierte Serumprobe	1:2	42,7	42,7	100
	1:4	44,2	42,7	103
	1:6	45,3	42,7	106
	1:8	43,4	42,7	101
	1:10	49,5	42,7	116
	1:16	39,1	42,7	91
niedrig konzentrierte Serumprobe	1:2	17,8	17,8	100
	1:4	17,3	17,8	97
	1:6	18,0	17,8	101
	1:8	17,5	17,8	98
	1:10	16,2	17,8	91
	1:16	16,9	17,8	95

Tab. 4: Nachweis der Verdünnungslinearität für den α -Synuclein ELISA an Hand zweier individueller Serumproben.

6.5.3 Intra- und Inter-Assay Variation

Die Variationskoeffizienten wurden durch Messung von acht verschiedenen Serumproben unterschiedlicher endogener α -Synucleinkonzentrationen bestimmt. Tab. 5 gibt die einzelnen Daten wieder. Für den Intra- und den Inter-Assay ergaben sich Werte von 3,9% und 9,3%.

Intra-Assay VK									
Serumprobe (1:3)	1	2	3	4	5	6	7	8	
Well 1	10,62	25,34	15,74	15,63	14,32	13,38	13,42	12,32	ng/ml
Well 2	10,45	26,31	15,68	17,34	14,81	11,89	13,21	12,52	ng/ml
Well 3	11,67	25,98	14,92	16,34	16,03	12,89	12,92	14,12	ng/ml
Well 4	10,15	24,92	15,38	17,66	15,79	13,18	13,80	13,39	ng/ml
Well 5	10,48	25,38	15,17	15,88	14,80	12,77	13,35	13,02	ng/ml
Well 6	11,23	26,46	14,84	15,30	14,72	12,52	13,39	12,97	ng/ml
Well 7	9,82	25,96	14,76	15,71	15,26	12,43	12,93	12,89	ng/ml
Well 8	10,39	26,52	15,63	17,45	14,02	11,23	13,89	14,32	ng/ml
Mittelwert	10,60	25,86	15,27	16,41	14,97	12,54	13,36	13,19	ng/ml
Standardabweichung	0,59	0,59	0,40	0,90	0,62	0,50	0,31	0,59	ng/ml
Intra-Assay VK	5,6	2,3	2,6	5,5	4,1	4,0	2,3	4,5	%
mittlerer Intra-Assay VK								3,9	%

Inter-Assay VK									
Serumprobe (1:3)	1	2	3	4	5	6	7	8	
Tag 1	11,47	26,35	16,84	16,69	16,44	13,22	14,50	13,74	ng/ml
Tag 2	8,91	22,63	14,01	15,15	13,75	10,95	11,64	12,31	ng/ml
Tag 3	9,53	21,35	13,79	13,67	13,48	10,92	11,94	11,34	ng/ml
Tag 4	10,60	25,86	15,27	16,41	14,97	12,54	13,36	13,19	ng/ml
Tag 5	12,62	25,74	16,09	16,44	14,62	13,36	13,54	13,07	ng/ml
Mittelwert	10,63	24,38	15,20	15,67	14,65	12,20	13,00	12,73	ng/ml
Standardabweichung	1,49	2,25	1,31	1,27	1,17	1,19	1,19	0,93	ng/ml
Inter-Assay VK	14,0	9,2	8,6	8,1	8,0	9,8	9,2	7,3	%
mittlerer Inter-Assay VK								9,3	%

Tab. 5: Intra- und Inter-Assay Variationskoeffizient (VK) für den α -Synuclein Serum ELISA

6.6 Etablierung des α -Synuclein Autoantikörper ELISAs für Liquor

Die Etablierung des Autoantikörper Assays für Liquorproben erfolgte in ähnlicher Weise, wie bei den Serumproben. Zur Vergleichbarkeit der Einzelergebnisse wurde ein Liquorpool, bestehend aus zehn individuellen Proben, hergestellt. Die verwendeten Proben stammten von neurologischen Patienten, bei denen zum Ausschluss eines entzündlichen zentralnervösen Prozesses oder zu therapeutischen Zwecken eine Liquorpunktion im Rahmen der klinischen Versorgung durchgeführt worden war. Die gepoolten Liquorproben wurden bis zu ihrer Verwendung bei -80°C gelagert.

Analog der Etablierung im Serum wurde zunächst der Anteil der unspezifischen Hintergrundaktivität im Liquor bestimmt. Liquor ist eine klare zellarme Flüssigkeit mit einem geringen Proteingehalt (0,2% des Gesamteiweißgehalts des Blutes) (Reiber 2006). Dementsprechend wurden Liquorproben initial pur oder 1:2 verdünnt und in wiederholten Durchgängen nach dem ELISA Ausgangsprotokoll in beschichteten, wie unbeschichteten Wells (2µg/ml α -Synuclein) inkubiert. Wie zu erwarten, zeigten die absoluten Absorptionswerte ein geringes Signal in beiden Welltypen. Es wurden unterschiedliche Blockierungs- und Verdünnungspufferkombinationen verwendet (Abb. 24).

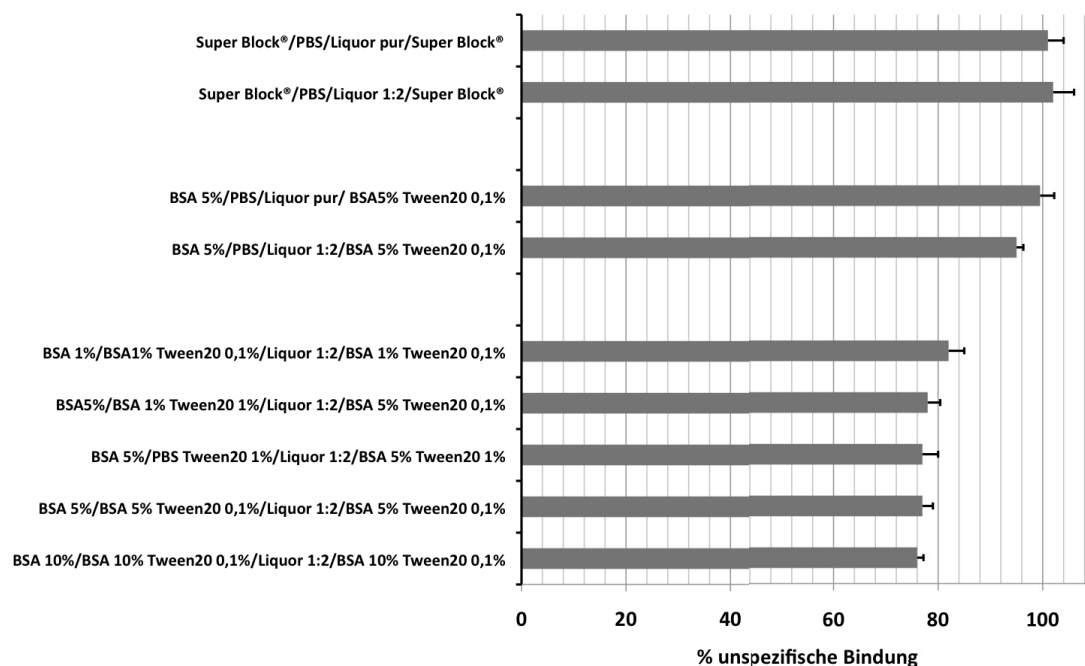


Abb. 24: Auflistung der getesteten Blockierungs- und Verdünnungslösungen. LESE: Blockierungslösung / Verdünnungslösung Liquorpool / Verdünnungsfaktor Liquorpool / Verdünnungslösung des Sekundärantikörpers. Angaben in Prozent der unspezifischen Bindung. Mittelwerte (n=3) ± Standardabweichung.

Der Anteil der unspezifischen Bindung konnte durch die getesteten Pufferkombinationen im besten Fall auf 77% gesenkt werden. Im folgenden Schritt wurden unterschiedliche α -Synuclein Beschichtungen (10/5/2,5/1/0,5/0,25 μ g/ml) miteinander bezüglich der unspezifischen Bindung verglichen. Auch hierdurch ließ sich ein spezifisches Signal durch Bindung des Autoantikörpers an α -Synuclein nicht ausreichend herstellen. Widersprüchlicherweise war mit abnehmender α -Synuclein Beschichtung auch eine leichte Abnahme der unspezifischen Bindung zu verzeichnen. Diese Beobachtung ließ sich am ehesten dadurch erklären, dass auf Grund der wahrscheinlich sehr geringen Autoantikörpermengen im Liquor bei einer höheren α -Synuclein Beschichtung sämtlich vorhandene Antikörper schon an α -Synuclein gebunden waren. Eine Zunahme an Antigen erzeugte daher keinen Signalzuwachs und das überschüssige α -Synuclein wirkte durch seine Plattenbindung blockierend auf das unspezifische Liquorsignal. Mit abnehmender α -Synuclein Beschichtung näherte sich das Ausmaß der unspezifischen Bindung dem Signal aus unbeschichteten Wells an, ohne dass sich ein Signal durch spezifische Bindung des Autoantikörpers an α -Synuclein davon abheben konnte. In einem weiteren Schritt wurde versucht durch

veränderte Inkubationsbedingungen der Liquorprobe das spezifische Signal zu fördern. Hierbei erfolgte die Probeninkubation für 4h bei RT, bei 37°C für 1-2h im Inkubator oder bei 4°C über Nacht. Keine der getesteten Bedingungen zeigte einen Effekt auf das spezifische Signal, so dass eine weitere Etablierung des Autoantikörper ELISAs für Liquorproben an dieser Stelle nicht weiter verfolgt wurde.

6.7 Messergebnisse im Serum

6.7.1 Klinische und demographische Daten der untersuchten Probanden

Serumproben wurden initial von 63 Patienten mit IPS, 43 Patienten mit AD und 46 gesunden Kontrollpersonen im Alter zwischen 58 und 83 Jahren akquiriert. In zwei Fällen (einmal in der Gruppe der Parkinson-Patienten und in der Gruppe der Alzheimer-Patienten) konnte die Serumkonzentration des natürlich vorkommenden Autoantikörpers wegen Werten unterhalb der Nachweisgrenze nicht bestimmt werden. Sie mussten daher in der nachfolgenden quantitativen Beurteilung ausgeschlossen werden. Tab. 6 fasst die erhobenen klinischen und epidemiologischen Daten, der am Ende untersuchten Probanden zusammen.

	gesunde Kontrollen	IPS	AD
Anzahl	46	62 (34)*	42
Geschlecht (weiblich/männlich)	20/26	27/35 (12/22)*	21/21
Alter (Jahre)	70,7 ± 5,3	68,6 ± 9,0 (69,5 ± 5,9)*	73,0 ± 5,6
Krankheitsdauer (Jahre)	k.A.	10,2 ± 6 (9,3 ± 5,5)*	k.A.
Alter bei Krankheitsbeginn (Jahre)	k.A.	60,1 ± 7,1 (60,2 ± 7,2)*	k.A.
Krankheitsschwere:			
Hoehn und Yahr Skala	k.A.	2,3 ± 0,9 (2,3 ± 0,9)*	k.A.
UPDRS**	k.A.	26,2 ± 12,6	k.A.
Mini Mental Status (MMSE)***	29 ± 1	27 ± 4	21 ± 5

Tab. 6: Klinische und demographische Daten der rekrutierten Probanden. * Serum α -Synuclein wurde nur in 34 Fällen der Gruppe der IPS-Patienten bestimmt. Die dazugehörigen klinischen und epidemiologischen Daten sind in Klammern angegeben, außer UPDRS und MMSE. ** UPDRS wurde bei 34 IPS-Patienten erhoben. *** MMSE Werte wurde bei 34 IPS-Patienten erhoben.

Hinsichtlich des mittleren Alters ergab sich nach ANOVA Test ein Unterschied zwischen den drei untersuchten Gruppen ($p=0,047$). Der anschließende paarweise multiple Vergleich der drei Gruppen im Einzelnen zueinander mit Bonferroni t-Test

ergab allerdings keinen signifikanten Unterschied mehr. Die Mini Mental Status Examination (MMSE) konnte nur von einem Teil der untersuchten IPS-Patienten erhoben werden. Dabei zeigte sich ein signifikanter Unterschied zwischen der AD-Gruppe und den beiden anderen diagnostischen Gruppen (beide $p < 0,001$; ANOVA). Der mittlere MMSE Wert von 21 der AD-Gruppe wies auf eine bislang leichte dementielle Störung bei den meisten untersuchten Patienten hin. Innerhalb der Parkinsongruppe waren lediglich zwei Patienten jünger als 50 Jahre bei Erkrankungsbeginn. Dadurch war eine mögliche Verzerrung der Studienergebnisse durch Einbeziehung unentdeckter familiär bedingter Parkinsonformen gering.

6.7.2 Messung der α -Synuclein Autoantikörperkonzentration im Serum

In einer hintereinander geschalteten Versuchsdurchführung wurden alle Serumproben auf zehn ELISA Platten verteilt und in Duplikaten gemessen. Auf jeder Platte befand sich eine Standardreihe, zwei Leerwerte (unbeschichtet und beschichtete Wells) sowie eine Referenzprobe mit bekannter Konzentration zur Kontrolle der Inter-Assay Präzision. Der Inter-Assay VK ergab mit einem Wert von 6,1% keinen Hinweis auf einen systematischen Fehler innerhalb der Versuchsdurchführung. Aus den Absorptionssignalen der beschichteten wie unbeschichteten Wells wurde nach Abzug des Leerwerts die Differenz gebildet und mit Hilfe der Standardgeradengleichung die Konzentration errechnet.

Die diagnostischen Gruppen wurden anschließend hinsichtlich ihrer Konzentration miteinander verglichen. Da die gemessenen Werte keine Normalverteilung aufwiesen ($p > 0,050$; Kolomogorov-Smirnov- und Shapiro-Wilk-Test) erfolgte der Vergleich der drei Gruppen mittels nicht-parametrischer Testung. Es zeigte sich ein statistisch signifikanter Unterschied zwischen den gesunden Kontrollen, Patienten mit IPS und AD ($p = 0,005$; Kruskal-Wallis-Test). In der Post-hoc paarweisen Analyse der Gruppen mittels Dunn's Methode unter Bonferroni-Anpassung ergab sich ein Unterschied ($p < 0,050$) zwischen den gesunden Kontrollen und der IPS-Gruppe ($p < 0,050$) sowie zwischen AD-Patienten und der IPS-Gruppe ($p < 0,050$). Kein Unterschied in der Konzentration des Autoantikörpers zeigte sich dagegen zwischen den gesunden Kontrollen und den AD-Patienten ($p > 0,050$) (Abb. 35).

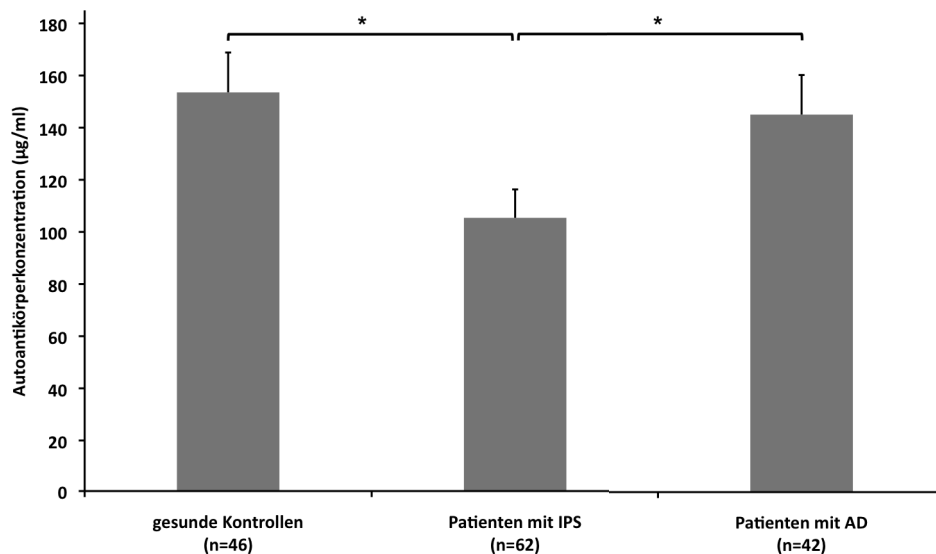


Abb. 25: Quantitative ELISA Messung der Konzentration des natürlich vorkommenden Autoantikörpers gegen α -Synuclein im Serum bei gesunden Kontrollen, Patienten mit IPS und AD. Die Autoantikörperkonzentration war bei Patienten mit IPS (Mittelwert \pm Standardfehler; $105,4 \pm 10,9 \mu\text{g/ml}$) signifikant reduziert im Vergleich zu gesunden Kontrollen ($153,5 \pm 15,3 \mu\text{g/ml}$; $*p < 0,050$) und zu Patienten mit Morbus Alzheimer ($144,9 \pm 15,2 \mu\text{g/ml}$; $*p < 0,050$). Mittelwerte \pm Standardfehler.

6.7.3 Korrelation: klinische und demographische Parameter und Autoantikörper gegen α -Synuclein

Die erhobenen klinischen und epidemiologischen Daten wurden mit den gemessenen Konzentrationen des Autoantikörpers verglichen. Wegen der fehlenden Normalverteilung der gemessenen Werte erfolgte die Bestimmung der Korrelation nach der Spearman'schen Rang Korrelationsmethode.

Es zeigte sich, dass die Konzentration des Autoantikörpers weder bei den gesunden Kontrollen ($r=0,081$; $p=0,594$ Spearman Korrelation), den Patienten mit IPS ($r=0,152$; $p=0,241$) noch den Patienten mit AD ($r=0,225$; $p=0,152$) vom Alter der Probanden abhing (Abb. 26).

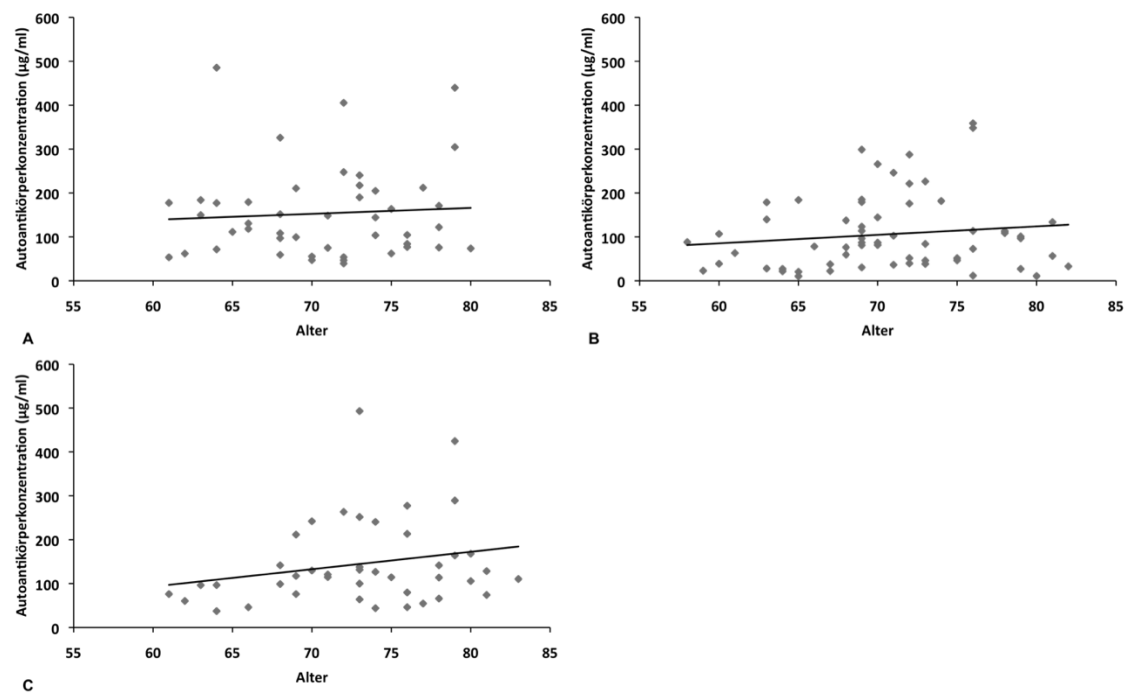


Abb. 26: Diagramm Alter und Konzentration des natürlich vorkommenden Autoantikörpers gegen α -Synuclein.
A: gesunde Kontrollen ($r=0.081$; $p=0.594$; Spearman Korrelation). **B:** Patienten mit IPS ($r=0.152$; $p=0.241$). **C:** Patienten mit AD ($r=0.225$; $p=0.152$).

Um zu bestimmen, ob sich die Serumkonzentration des Autoantikörpers im Laufe der Krankheitsprogression verändert, wurden die gemessenen Werte nach dem klinischen Schweregrad, basierend auf der Hoehn und Yahr Skala, sortiert und verglichen. Die statistische Auswertung mit Kruskal-Wallis-Test ergab keinen Zusammenhang zwischen dem Antikörperniveau und dem klinischen Stadium ($p=0.112$; Abb. 27). Als differenzierte Evaluierungsmethode der Krankheitsschwere war bei einer Untergruppe der Parkinsonpatienten ($n=34$) zusätzlich noch der motorische Anteil der UPDRS erhoben worden. Wegen der hohen Übereinstimmung zwischen UPDRS und den Hoehn und Yahr Stadien ($p<0.001$; Spearman Korrelation), war es nicht überraschend, dass auch hier keine Korrelation mit der Autoantikörperkonzentration gefunden wurde ($r=0.134$; $p=0.448$; Abb. 27). Die Krankheitsdauer, gemessen in Jahren, korrelierte ebenfalls nicht mit der Konzentration des Autoantikörper im Serum ($r=0.064$; $p=0.624$; Abb. 27). Hierbei ist anzumerken, dass die Krankheitsdauer, wie auch in diesem Fall, natürlicherweise mit der klinischen Schwere (Hoehn und Yahr) der Krankheit häufig gut korreliert ($p<0.001$; Spearman Korrelation).

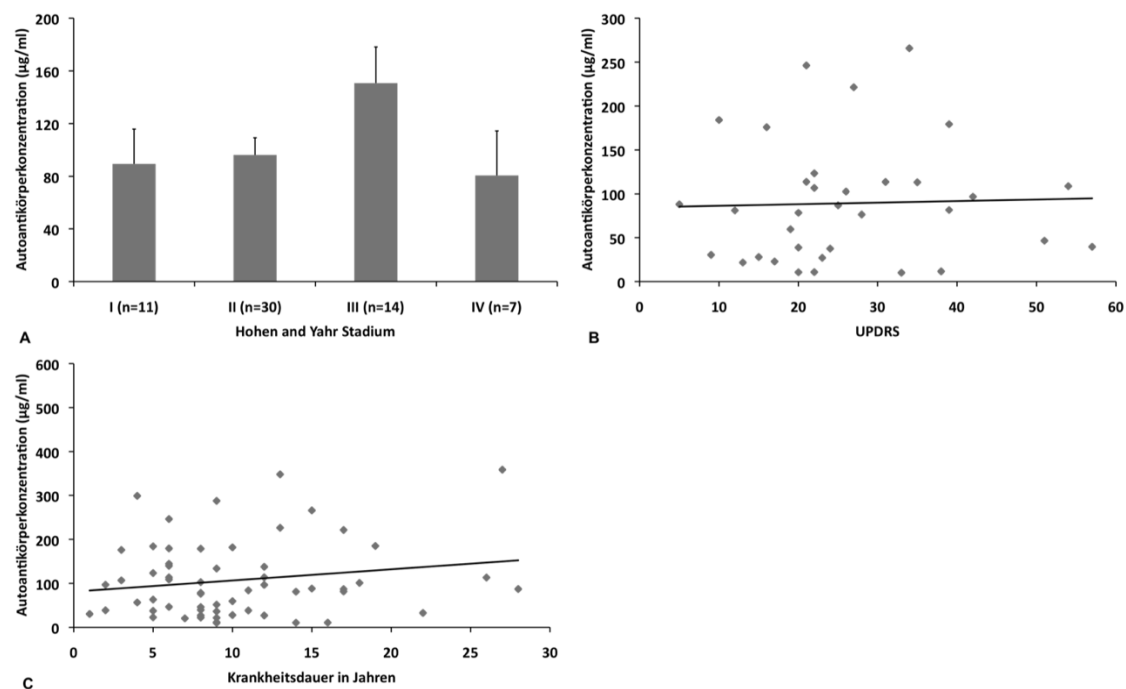


Abb. 27: A: Hoehn und Yahr Stadium und Konzentration des natürlich vorkommenden Autoantikörpers gegen α -Synuclein ($p=0,112$; Kruskal-Wallis-Test). Mittelwerte \pm Standardfehler. **B: UPDRS und Konzentration des natürlich vorkommenden Autoantikörpers gegen α -Synuclein** ($r=0,134$; $p=0,448$; Spearman Korrelation). Anmerkung: Die Beurteilung nach UPDRS stand nur bei einem Teil der IPS-Patienten zur Verfügung ($n=34$). **C: Krankheitsdauer und Konzentration des natürlich vorkommenden Autoantikörpers gegen α -Synuclein** ($r=0,064$; $p=0,624$; Spearman Korrelation).

6.7.4 ROC Analyse: Sensitivität und Spezifität des Autoantikörper Serum ELISAs

Die Wertepaare für die Sensitivität und Spezifität wurden an Hand der theoretisch möglichen Schwellenwerte innerhalb des Messbereichs mittels ROC Analyse bestimmt. Die graphische Darstellung erfolgte separat für die Differenzierung zwischen IPS-Patienten und gesunden Kontrollen bzw. AD-Patienten (Abb. 28). Als AUC ergab sich für IPS-Patienten vs. gesunden Kontrollen ein Wert von 0,662 (95% Konfidenzintervall: 0,561-0,763) und für IPS- vs. AD-Patienten ein Wert von 0,650 (95% Konfidenzintervall: 0,545-0,754). Die AUCs unterschieden sich damit signifikant ($p<0,05$ in beiden Fällen) von der Diagonalen (Nullhypothese mit Wahrheitswert 0,5).

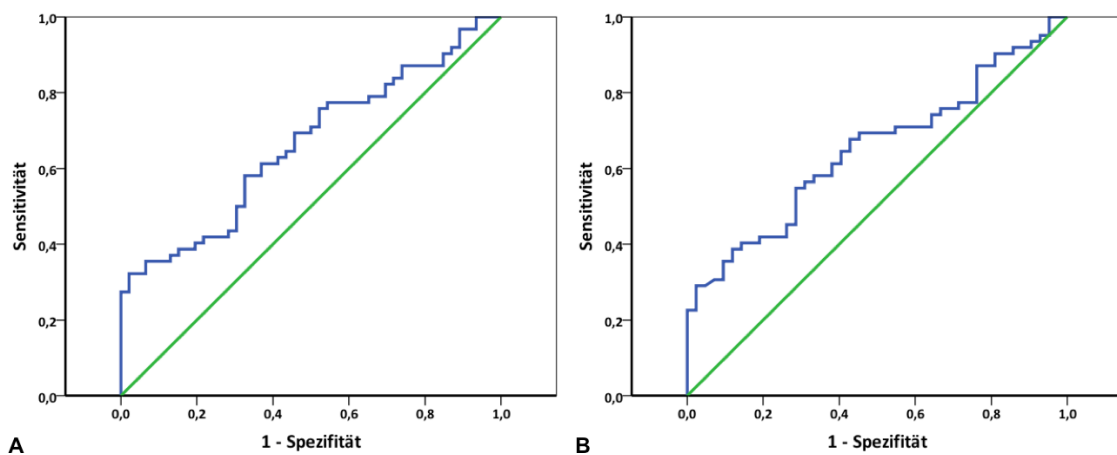


Abb. 28: ROC Kurven α -Synuclein Autoantikörper Serum ELISA. **A:** ROC Kurve beim Vergleich IPS-Patienten vs. gesunder Kontrollen mit einer AUC von 0,662. **B:** ROC Kurve beim Vergleich von IPS-Patienten vs. AD-Patienten mit einer AUC von 0,650. Blaue Linie: ROC Kurve. Grüne Linie: Diagonale (AUC = 0,5).

Zur besseren Übersicht und Bestimmung von geeigneten Schwellenwerten zur Differenzierung zwischen den diagnostischen Gruppen wurden die Sensitivität und Spezifität in Abhängigkeit aller theoretischen Schwellenwerte graphisch aufgetragen (*Two-Graph-ROC Analyse* Abb. 29). Schwellenwerte wurden, wie im Methodenteil beschrieben, nach der gleichwertigen Gewichtung von Sensitivität und Spezifität (Sensitivität = Spezifität; Schnittpunkt der beider Kurven), nach dem Youden-Index und unter Vorgabe eines Sensitivität von größer 85% ermittelt. Tab. 7 fasst die Ergebnisse getrennt nach diagnostischer Differenzierung (IPS-Patienten vs. gesunde Kontrollen und IPS- vs. AD-Patienten) zusammen. Die Berechnung des Youden-Index ergab für die Differenzierung zwischen IPS-Patienten vs. gesunde Kontrollen einen Wert von 0,31 und für IPS- vs. AD-Patienten einen Wert von 0,26.

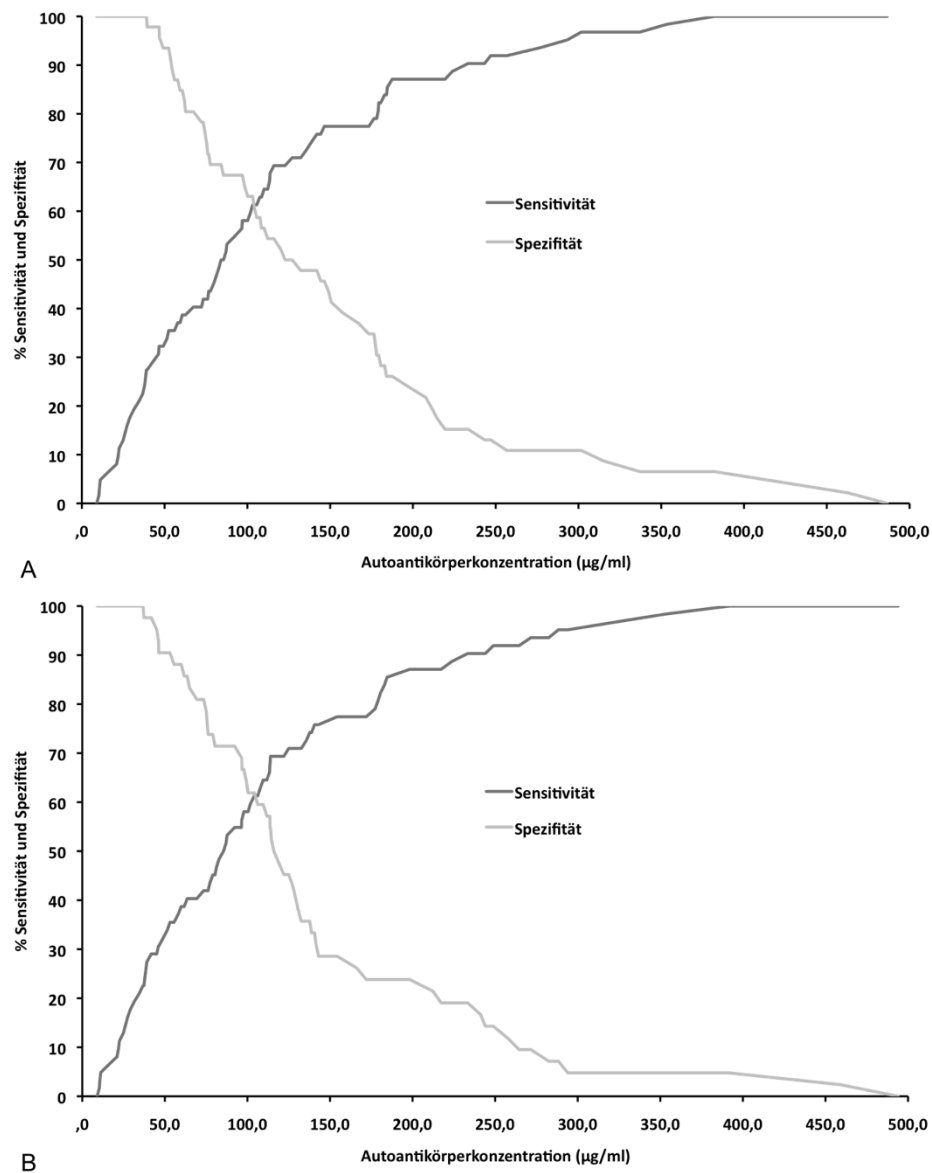


Abb. 29: Two-Graph-ROC Analyse. A: IPS-Patienten vs. gesunde Kontrollen. B: IPS- vs. AD-Patienten. Sensitivität und Spezifität wurden als Funktionen der theoretischen Schwellenwerte des gesamten Messbereichs der Autoantikörperkonzentration aufgetragen.

Bedingung	Schwellenwert (µg/ml)	IPS-Patienten vs. gesunde Kontrollen		IPS- vs. AD-Patienten	
		Sensitivität (%)	Spezifität (%)	Sensitivität (%)	Spezifität (%)
Sensitivität = Spezifität	104,00	61	61	61	61
nach Youden-Index	46,65	32	98	30	95
Sensitivität > 85%	187,50	87	26	85	24

Tab. 7: Sensitivität und Spezifität des Autoantikörper ELISAs nach unterschiedlichen Bedingungen.

6.7.5 Messung der α -Synucleinkonzentration im Serum

Analog der Messung des natürlichen Autoantikörpers wurde in einer hintereinander geschalteten Versuchsdurchführung die Konzentration des freien α -Synucleins im Serum bestimmt. Die Messung erfolgte pro Serumprobe in Duplikaten auf 4 ELISA Platten. Pro Platte wurden eine Standardreihe und eine Referenzprobe mit bekannter Konzentration zur internen Kontrolle mitgeführt. Der Inter-Assay VK lag mit einem Wert von 12,3% im Akzeptanzbereich. Aus den gemessenen Absorptionssignalen wurde nach Abzug des Leerwerts mit Hilfe der Standardgeradengleichung die Konzentration bestimmt.

Die Messung der Konzentration des freien α -Synucleins im Serum erfolgte bei allen gesunden Kontrollen (n=46), Patienten mit AD (n=42) und Patienten mit IPS (hier: n=34). Da die gemessenen Werte keine Normalverteilung aufwiesen ($p > 0,050$; Kolomogorov-Smirnov- und Shapiro-Wilk-Test) erfolgte der Vergleich der drei Gruppen mittels nicht-parametrischer Testung. Obgleich sich eine höhere Serumkonzentration des freien α -Synucleins bei den Patienten mit IPS als bei den gesunden Probanden und den AD-Patienten zeigte, erwies sich der Unterschied als statistisch nicht signifikant ($p = 0,540$; Kruskal-Wallis-Test; Abb. 30). Wegen dem fehlenden Unterschied zwischen den Gruppen konnte auf eine ROC Analyse verzichtet werden.

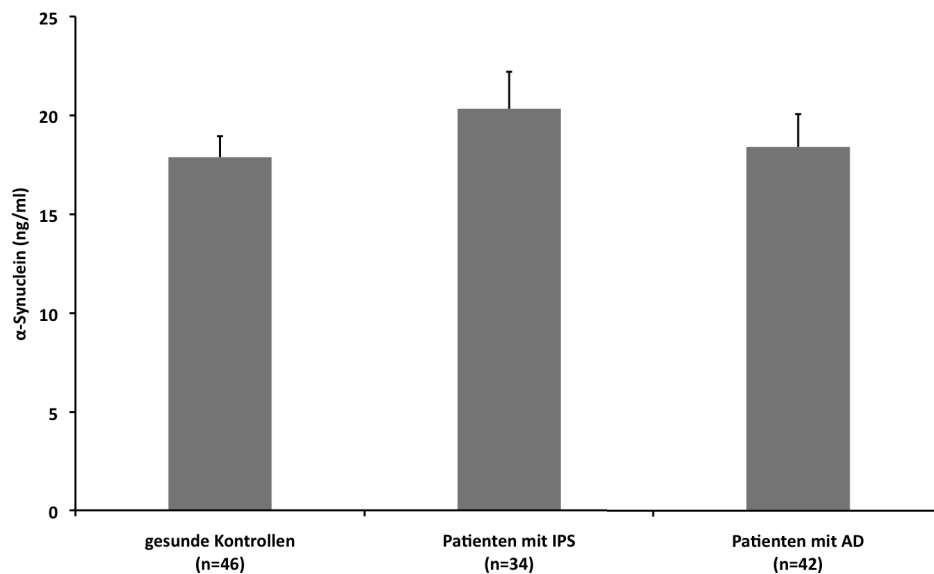


Abb. 30: Quantitative ELISA Messung der Konzentration des α -Synucleins im Serum bei gesunden Kontrollen, Patienten mit IPS und AD. Die α -Synucleinkonzentration unterschied sich nicht zwischen den gesunden Kontrollen (Mittelwert \pm Standardfehler; $17,9 \pm 1,0$ ng/ml), den Patienten mit IPS ($20,3 \pm 1,9$ ng/ml) und den Patienten mit AD ($18,4 \pm 1,7$ ng/ml). Mittelwerte \pm Standardfehler.

6.7.6 Korrelation: freies α -Synuclein und Autoantikörper gegen α -Synuclein im Serum

Um abschätzen zu können inwieweit endogen im Serum vorhandenes α -Synuclein sich auf die Detektion und Quantifikation des natürlich vorkommenden Autoantikörpers auswirkt, wurden die beiden gemessenen Konzentrationen miteinander korreliert. Dabei zeigte sich, dass die im Assay gemessene Konzentration des Autoantikörpers nicht von der Höhe des bestimmbar freien α -Synucleins abhing ($r=0,0384$; $p=0.674$ Spearman Korrelation; Abb. 31). Im Zusammenhang mit den guten *Recovery* Raten bei zugesetzten Autoantikörpermengen im Serum (siehe *Spike-Recovery* Test) bestätigte sich, dass endogen vorhandenes α -Synuclein keinen nennenswerten Einfluss auf die Bestimmung des natürlich vorkommenden Antikörpers nahm.

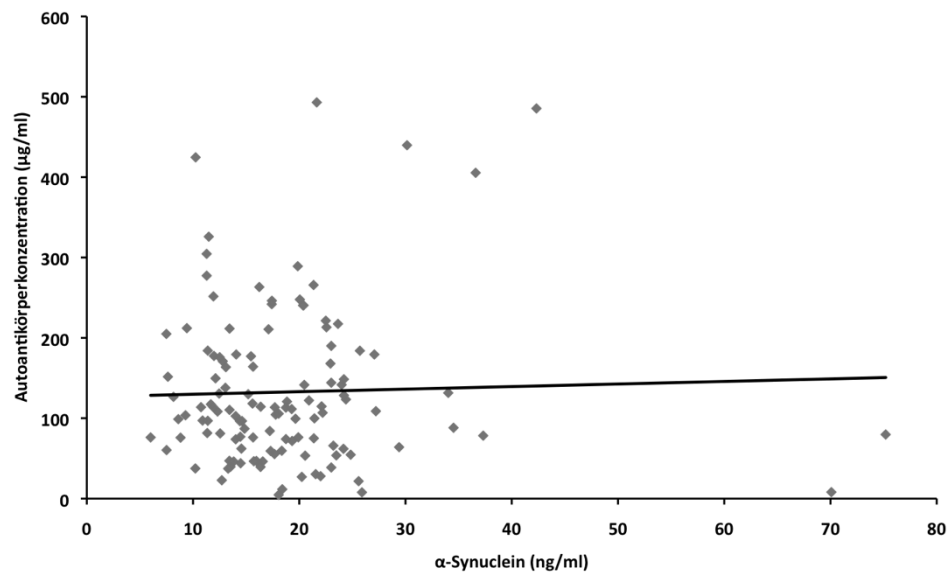


Abb. 31: Diagramm Konzentration des freien α -Synuclein im Serum und des natürlich vorkommenden Autoantikörpers gegen α -Synuclein im Serum. Es zeigte sich keine Korrelation zwischen den beiden bestimmten Konzentrationen ($r=0,0384$; $p=0,674$ Spearman Korrelation).

7 DISKUSSION

7.1 Diskussion präanalytischer Aspekte

7.1.1 Patientenrekrutierung und klinische Datenerhebung

Die Patientenrekrutierung und Akquirierung des Serummaterials erfolgte unabhängig voneinander an unterschiedlichen Kliniken. Die Patienten, die nicht an der Klinik für Neurologie der Universität Marburg und der Parkinsonklinik Bad Nauheim in die Studie eingeschlossen wurden, nahmen an anderen klinischen Studien an den jeweiligen Kliniken teil. Dort erfolgte ebenfalls neben der klinisch-diagnostischen Beurteilung eine Blutentnahme im Rahmen des Studienprotokolls. Die Diagnose eines IPS wird, wie in der Einleitung schon diskutiert, klinisch gestellt und ist auch bei erfahrenen Neurologen einer gewissen Fehlerrate unterworfen (Hughes et al. 2002). In ähnlicher Weise kann die Diagnose einer Alzheimer Demenz definitiv erst *post mortem* und zu Lebzeiten nur nach einer gewissen Wahrscheinlichkeit erfolgen (Ballard et al. 2011). Mit dieser Problematik haben alle Studien zu neurodegenerativen Erkrankungen zu kämpfen. Eine Minimierung der diagnostischen Unsicherheit lässt sich am besten durch operationalisierte Diagnosekriterien erreichen, wie die UK Brain Bank Kriterien für das IPS (Gibb 1988) oder die Kriterien der NINCDS-ADRDA für die Alzheimer Demenz (McKhann et al. 1984). Nichts desto trotz birgt die Rekrutierung ganzer diagnostischer Gruppen an unterschiedlichen Kliniken die Gefahr nicht zu kontrollierender systematischer Fehler. Neben der klinischen Diagnose kann die Evaluierung der Krankheitsschwere mittels Hoehn und Yahr Skala oder UPDRS einer sehr schwankenden, von der Erfahrung des Untersuchers abhängigen Interrater-Reliabilität unterworfen sein (Richards et al. 1994; Goetz et al. 2004). In der vorliegenden Arbeit stammten 28 IPS-Patienten aus der Universitätsklinik für Neurologie Innsbruck und 34 IPS-Patienten aus der Klinik für Neurologie der Universität Marburg und der Parkinsonklinik Bad Nauheim. In den Gruppen wurde das Hoehn und Yahr Stadium von unterschiedlichen Untersuchern bestimmt. Dadurch ergab sich möglicherweise eine schwer zu quantifizierende Verzerrung in der Bewertung der Krankheitsschwere, die letztendlich auch die fehlende Korrelation mit der Autoantikörperkonzentration bewirkt haben könnte. Die Evaluierung nach UPDRS (motorischer Anteil) wurde dagegen einmalig bei der zweiten Gruppe (n=34) durch den Autor der Dissertation selbst durchgeführt und unterliegt damit nicht dem Problem der Interrater-Reliabilität.

Die Schulung zum UPDRS erfolgte nach dem offiziellen Lehrvideo der *Movement Disorder Society* (Goetz et al. 1995). Da sich alle rekrutierten Patienten zum Zeitpunkt der Studie in medikamentöser Behandlung befanden, wurde der motorische Anteil des UPDRS im on-Zustand der Patienten erhoben, also während der Wirkphase der Antiparkinson-Medikamente. Das Abschneiden im motorischen Anteil der UPDRS ist dabei entscheidend von der Güte der medikamentösen Einstellung des Patienten abhängig. Die Bewertung der individuellen Krankheitsschwere mittels UPDRS unterliegt daher immer einer substantiellen Verzerrung durch die individuell angepasste Therapie des Patienten. Was einerseits für die Prüfung des symptomatischen Effekts eines Therapeutikums von Vorteil ist, stellt einen schwer zu kontrollierenden Störfaktor für die Bestimmung der tatsächlichen „biologischen“ Krankheitsschwere im Sinne des neurodegenerativen Prozesses dar. Die einmalige Messung des UPDRS im on-Zustand lässt sich daher strenggenommen nur bedingt als Indikator der Krankheitsschwere zur diagnostischen Testung eines Biomarkers heranziehen. Er wurde in der vorliegenden Arbeit dennoch wegen seiner weiten Verbreitung, seiner guten Anwendbarkeit im klinischen Setting und mangels gut validierter Alternativen angewendet.

7.1.2 Umgang mit den verwendeten Serumproben

Ein weiterer wichtiger Kritikpunkt zur multizentrischen Akquirierung des Probenmaterials liegt in dem teilweise uneinheitlichen Ablauf der Verarbeitung des entnommen Blutes, der Serumherstellung, der Probenlagerung und des Probentransportes nach Marburg zur Analyse. All diese Punkte können theoretisch Auswirkung auf die spätere Messung eines Analyten, wie des α -Synuclein Proteins oder des Autoantikörpers gegen α -Synuclein, haben (Schrohl et al. 2008). Da sich das Probenmaterial aus unterschiedlichen Studien zusammensetzte, existierte keine zuvor definierte einheitliche Vorgehensweise beim präanalytischen Umgang mit den Serumproben. Nach groben Schätzungen haben mehr als 50% der Fehler im diagnostischen Prozess der klinischen Chemie ihren Ursprung in der präanalytischen Phase (Carraro and Plebani 2007; Lippi et al. 2006a). Nur ein geringer Teil der Fehler (13-32%) ereignen sich wegen mittlerweile gut implementierter Validierungsstandards dagegen während der Probenanalyse (Bonini et al. 2002). Studien zeigen, dass je nach Verarbeitung des Probenmaterials, Art der Lagerung, Häufigkeit des Einfrierens und Auftauens, Dauer der Lagerung und Art des Analyten erhebliche Messunterscheide

auftreten können (Gislefoss et al. 2008; Wilson et al. 1972). Die fehlende Implementierung einfacher Leitlinien und Protokolle zum Probenumgang in der präanalytischen Phase ist möglicherweise einer der Gründe, warum nur wenige Biomarker sich trotz der enormen Anzahl an vielversprechenden Studien klinisch bewährt haben (Schrohl et al. 2008). Dieses Problem wurde mittlerweile erkannt und führte zur Einführung von verbindlichen Richtlinien, sogenannter *Standard Operating Procedures* (SOPs), im Umgang mit Blut oder Liquor in einigen Forschungskonsortien wie dem deutschen Kompetenznetz Demenz (Lewczuk et al. 2006). Wie schon angesprochen, hängt die Messvariation bei unterschiedlichen präanalytischen Bedingungen erheblich von der Art des Analyten (DNA, RNA, Antikörper, Peptide, Enzyme, Hormone, Zytokine oder Vitamine) ab (Chaigneau et al. 2007). Zytokine sind von Natur aus äußerst instabil und unterschiedliche Lagerungsbedingungen der Blutproben haben erheblichen Einfluss auf die später gemessene Konzentration (Flower et al. 2000). Dagegen zeigen proteinerge Tumormarker, wie AFP und CEA, auch nach wiederholtem Einfrieren und Auftauen nur eine geringe Konzentrationsabnahme (Gao et al. 2007). Peptid- und Steroidhormone, wie Prolaktin und Testosteron, weisen eine hohe Stabilität bei -80°C über 3 Jahre auf (Bolelli et al. 1995). Im Fall von Immunglobulinen der Klasse G im Serum zeigte sich ebenfalls eine hohe Robustheit gegenüber der Aufbewahrungsdauer und der Häufigkeit des Auftauens und Einfrierens. Auch nach 100 Zyklen (Einfrieren und Auftauen) oder Aufbewahrung bei 37°C über 10 Tage veränderte sich die gemessene Konzentration und Avidität von anti-HBs IgG im Serum um weniger als 30% der Ausgangswerte (Chaigneau et al. 2007). In einer anderen Studie zeigte sich ebenfalls bei der Messung verschiedener IgG Moleküle eine stabile Konzentration im ELISA nach zehnmaligen Einfrieren und Auftauen (Pinsky et al. 2003). Studien bezüglich die Stabilität von IgG im gefrorenen Serumproben über einen längeren Zeitraum sind rar. Allgemein wird über eine gute Haltbarkeit von Antikörpern im Serum bei -70°C für einen längeren Zeitraum berichtet (Petrakis 1985). Eine Studie zu anti-TPO und anti-Tg IgG in Serumaliquots, die für 23 Jahre bei -25°C konserviert wurden, berichtete von stabilen Autoantikörperkonzentrationen bis maximal 14 Jahre nach Einlagerung (Mannisto et al. 2007). Auch bei der Messung der Aktivität von Antiseren wurden nach 3 Jahren Lagerung bei -40°C gleiche Werte in Radioimmuno-Assays erzielt (Middleton et al. 1988).

In der vorliegenden Arbeit wurde ein Auftauen der Proben vor ihrer Verwendung vermieden. Die Lagerung erfolgte nach allgemeiner Empfehlung bei -80°C (Lewczuk et al. 2006; Schrohl et al. 2008). Die Serumproben wurden beim Transport in spezielle Kühlboxen aus Styropor unter Zugabe einer ausreichenden Menge Trockeneis gelagert. Zum Zeitpunkt der Messung mit ELISA waren die Proben von IPS-Patienten (Universitätsklinik für Neurologie Innsbruck, Klinik für Neurologie der Universität Marburg und Parkinson-Klinik Bad Nauheim) $2,2 \pm 1,5$ Jahre, von AD-Patienten $2,4 \pm 0,2$ Jahre und von gesunden Kontrollen $2,3 \pm 0,3$ Jahre (beide Klinik und Poliklinik für Psychiatrie und Psychotherapie Universität Bonn) dauerhaft bei -80°C tiefgefroren (Angabe als Mittelwert \pm Standardabweichung). Der Einfluss der Lagerungsdauer der Serumproben auf die gemessenen Konzentrationen des α -Synuclein Proteins und des Autoantikörpers gegen α -Synuclein konnte nach Sichtung der Literatur als höchstwahrscheinlich vernachlässigbar betrachtet werden (Boelli et al. 1995; Mannisto et al. 2007; Petrakis 1985). Eine empirische Testung der Stabilität der Komponenten nach Einfrieren und Auftauen und im Bezug auf die Lagerungsdauer wurde allerdings nicht durchgeführt, so dass strenggenommen eine dadurch bedingte Verzerrung der Ergebnisse letzten Endes nicht ausgeschlossen werden konnte.

7.2 Diskussion methodologischer Aspekte

7.2.1 Umgang mit der unspezifischen Hintergrundaktivität des Serums

Die Problematik unspezifischer Hintergrundaktivität humaner Serumproben in indirekten ELISA Anwendungen, insbesondere bei der Messung niedrig-affiner natürlicher Autoantikörper in geringen Konzentrationen, ist bekannt (Klaver et al. 2010; Pellegrino and Caccavo 2007; Porat et al. 1995; Szabo et al. 2010). Auch in der vorliegenden Assay-Etablierung zeigte sich, dass die unspezifische Aktivität des Serums einen erheblichen Einfluss auf das gemessene ELISA Absorptionssignal in unbeschichteten und α -Synuclein Wells hatte und zudem große interindividuelle Unterschiede aufwies (Abb. 15). Dennoch ergab die gemessene Absorption in der klaren Mehrzahl der untersuchten Fälle höhere Werte in α -Synuclein Wells als in unbeschichteten Wells. Die Hintergrundaktivität wird durch die Bindung humaner IgG Serummoleküle an die Polystyrenoberfläche der ELISA Platte hervorgerufen (Fujii et al. 1989; Kenna et al. 1985). Durch Vorinkubation der Serumproben mit Protein G, wie in der Arbeit gezeigt

(Abb. 8), ließ sich konsequenterweise die Hintergrundaktivität auf das Niveau des Leerwertes reduzieren. Die Bindung von Antikörpern an die Polystyrenoberfläche wird durch die Antigen-bindende Region (F_{ab}) der IgG Moleküle hervorgerufen und nicht durch eine unspezifische Interaktion andere IgG Domänen, wie des F_c -Anteils (Szabo et al. 2010). Die Bindung an ELISA Wells muss als eine polyreaktive Eigenschaft verschiedener Serumantikörper betrachtet werden und nicht als eine unspezifische lockere Adsorption von IgG Molekülen an die Polystyrenoberfläche. Daher ließ sich diese Hintergrundbindung durch die verfügbaren Blockierungsproteine nicht so weit reduzieren, dass sie zu vernachlässigen gewesen wäre. Zwar zeigten die verwendeten Blockierungs- und Verdünnungslösungen untereinander erhebliche Unterschiede in der Reduktion der Hintergrundaktivität des Serums in unbeschichteten Wells, doch ließ sich das Signal auch mit der besten Kombination nicht vollständig unterbinden (Abb. 9). Die in der vorliegenden Arbeit getesteten Blockierungsproteine wurden nach sehr unterschiedlichen Gesichtspunkten ausgewählt. Casein und gelöstes Magermilchpulver sind eine Mischung aus Milchproteinen unterschiedlicher Größe und Aminosäuresequenz und sollen auf Grund ihrer kleinen Molekülmasse und amphipatischen Eigenschaften nach der Antigenbeschichtung übrig gebliebene freie Bindungsflächen daher gut absättigen können (Vogt et al. 1987). Die Verwendung von fetalem Kälberserum oder adultem Ziegenserum beruhte auf der theoretischen Überlegung, dass endogen enthaltene IgG der jeweiligen Spezies kompetitiv mit den humanen Immunglobulinen der Serumprobe an der Plastikoberfläche binden (Fujii et al. 1989). Bei dem kommerziell erhältlichen Roti[®]-Block handelt es sich um ein proteinfreies Blockierungsreagenz auf Polymerbasis. Eine Maskierung spezifischer Bindungsstellen durch Fremdproteine, wie bei den anderen Blockierungslösungen, wurde dadurch ausgeschlossen (nach Produktinformation des Herstellers). Im Vergleich aller verwendeten Blockierungsreagenzien zeigte BSA den besten Effekt in der Reduktion unspezifischer Bindung, insbesondere wenn die Serumverdünnung ebenfalls in BSA 5% in PBS erfolgte (Abb. 9). Der Zusatz des Detergenz Tween20 in den Verdünnungspuffer steigerte zusätzlich das spezifische Signal in α -Synuclein beschichteten Wells ohne interessanterweise blockierende Eigenschaften im Bezug auf die Hintergrundaktivität des Serums zu zeigen (Abb.10 und 11). Tween20 ist ein nicht-ionisches Detergenz, dass lockere hydrophobe Wechselwirkungen zwischen Antikörpern und unspezifischen Komponenten der Serummatrix verhindert und somit nur spezifische Antigen-Antikörper-Bindungen zulässt (Mohammad and Esen 1989). Der hier beobachtete signalsteigernde Effekt von Tween20 ist möglicherweise der

polyreaktiven Bindungseigenschaft von natürlichen Autoantikörpern geschuldet. Es ist anzunehmen, dass durch die Tween20 Wirkung weitere im Serum vorhandene α -Synuclein Autoantikörper, die vorher durch lockere Bindung an andere Serumantigene maskiert gewesen waren, für die Bindung an beschichtetem α -Synuclein mobilisiert wurden. Ein vergleichbarer Signaleffekt von Tween20 im ELISA wurde bereits bei natürlichen Autoantikörpern gegen Cardiolipin beschrieben (Cheng 1996). Erwähnenswert ist, dass in der ursprünglichen ELISA Prozedur kein Blockierreagenz, sondern einzig Tween20 in PBS für alle Lösungen verwendet wurde (Engvall and Perlmann 1972). Die alleinige Verwendung von Tween20 reichte im vorliegenden Assay aber für die Reduktion des Anteils der unspezifischen Bindung nicht aus. Es gibt in der Literatur Hinweise, dass die strukturelle Beschaffenheit der Polystyrenoberfläche je nach Plattenhersteller Einfluss auf ihre Affinität gegenüber Antikörpern haben kann (Ravindranath et al. 1994). Es wurden daher unterschiedliche Platten-Typen verschiedener Hersteller mit hohen und niedrigen hydrophoben Bindungseigenschaften getestet. Bezüglich der Hintergrundaktivität des Serums zeigten die Platten allerdings keine Unterschied (Abb. 12). In diesem Zusammenhang muss ebenfalls erwähnt werden, dass der pH-Wert der verwendeten Puffer die Ladungseigenschaften der Polystyrenoberfläche verändern kann und dadurch Serumantikörper mehr oder weniger gebunden werden können (Kuen et al. 1993). Die pH-Abhängigkeit der unspezifischen Bindung wurde hier allerdings nicht getestet, da keine Daten darüber bestanden, wie sich die Struktur des α -Synucleins und damit seine Antigenität unter nicht-physiologischen pH-Bedingungen verändert.

Neben der Verwendung von blockierenden Proteinen, Detergenzien und Puffern gibt es noch weitere Ansätze, insbesondere durch Vorbehandlung der Proben, zur Reduktion der unspezifischen Bindung. Durch Inkubation von Antikörperlösungen in einer Polystyren-Säule vor ihrer Testung in A β Monomer und unbeschichteten ELISA Wells wurde beispielsweise versucht polyreaktive an Plastik bindende Antikörper zu entfernen. Das Verhältnis der absoluten Absorptionswerte aus beiden Well-Typen blieb aber unverändert konstant, was darauf hinwies, dass einige Autoantikörper gegen A β Monomere polyspezifisch auch an Polystyren binden können (Szabo et al. 2010). Eine Vorinkubation der Serumproben in Polystyrensäulen wurde in der vorliegenden Arbeit nicht versucht. Auch konnte gezeigt werden, dass eine Säurevorbehandlung von Serum in so genannten Säuredissoziationsverfahren zu gesteigerten Titern polyreaktiver Antikörper, insbesondere gegen Autoantigene, führt (Bouvet et al. 2001; Djoumerska et

al. 2005). Durch Säuredissoziation kommt es wegen des pH-Abfalls ($\text{pH} < 3$) zu einem Aufbruch niedrig- bis hochaffiner Antigen-Antikörperbindungen im Serum. Der Theorie nach kann damit eine Maskierung der Antikörperkonzentration, die durch Bindung der Antikörper an endogen vorhandene Antigene im Serum verursacht wird, aufgehoben werden. Nach Dissoziation von endogenen Antigenen können die Antikörper in der anschließenden ELISA Inkubationsphase unter Neutralisierung des pH-Werts mit dem im Überschuss vorhandenen exogenen Antigen der soliden Phase komplett interagieren und somit detektiert werden (Li et al. 2007a; Patton et al. 2005). Damit ließe sich möglicherweise ähnlich dem Tween20 Effekt der spezifische Anteil des Signals aus α -Synuclein Wells anheben. Die guten Ergebnisse im *Spike-Recovery*-Test unter Verwendung von Tween20 und die fehlende Korrelation zwischen α -Synuclein- und der Autoantikörperkonzentration im Serum deuten allerdings auf keine übermäßige Maskierung der Autoantikörperreaktivität durch endogenes α -Synuclein oder andere Serumbestandteile hin. Zudem ist bekannt, dass durch die Säurevorbehandlung von Serumantikörpern, wegen der teilweise irreversiblen strukturellen Veränderung der F_{ab} Domäne unter niedrigen pH-Werten, eine artifizielle Polyspezifität *in vitro* induziert werden kann, die das Bindungsvermögen verschiedenster Antikörper steigert. Dadurch werden nach Säuredissoziation häufig falsch hohe Antikörperkonzentrationen gemessen (Dimitrov et al. 2007). Dieses Problem betrifft auch die häufig eingesetzte Methode der Aufreinigung von IgG Moleküle aus nativen Serumproben oder IVIg durch Protein G Chromatographie zur anschließenden spezifischen Untersuchung im ELISA (Dimitrov et al. 2007; Djoumerska et al. 2005). Letzteres ist wahrscheinlich teilweise für die Heterogenität der Ergebnisse im Fall der Messung der natürlichen Autoantikörper gegen A β im humanen Serum bei Alzheimer-Patienten und gesunden Kontrollprobanden verantwortlich (Szabo et al. 2010).

Dem Anteil der unspezifischen Bindung am Gesamtsignal aus α -Synuclein Wells musste auf Grund seiner teilweisen hohen und interindividuell sehr unterschiedlichen Werte Rechnung getragen werden. In der Literatur wird daher zur Steigerung der spezifischen Aussagekraft von indirekten ELISA Ergebnissen die parallele Messung von unbeschichteten und mit Antigen beschichteten Wells und die anschließende systematische Subtraktion der gemessenen Hintergrundaktivität jeder individuellen Serumprobe vom Signal aus Antigen-Wells als adäquates Verfahren empfohlen (Cowchock et al. 1988; Klaver et al. 2010; Kuen et al. 1993; Pellegrino and Caccavo 2007; Rupin et al. 1991). Alternativ hätte auch der Quotient aus dem Signal aus α -

Synuclein und unbeschichteten Wells gebildet werden können (*signal:noise* Quotient). Auf Grund der Tatsache, dass der affinitätsgereinigte IVIg Autoantikörper selbst eine vernachlässigbare Bindung in unbeschichteten Wells zeigte (Abb.16), hätten sich aber die im Serum bestimmten Quotienten nicht innerhalb der Standardkurve befunden.

7.2.2 Beurteilung der Autoantikörpermessung im Liquor

Die Etablierung des Autoantikörper ELISAs für Liquor folgte analog der Etablierung im Serum. Trotz umfangreicher Änderungen des ELISA Protokolls mit Austestung verschiedener Blockier-/Verdünnungslösungen, α -Synuclein Beschichtungen und Inkubationsbedingungen ließ sich kein verwertbares Signal aus Liquorproben extrahieren. Die Differenz aus beschichteten zu unbeschichteten Wells ergab ein geringes und sehr inkonsistentes Signal, das nicht sicher auf eine spezifische Bindung von Autoantikörpern an beschichtetes α -Synuclein zurückzuführen war (Abb. 24). Papachroni et al. (2007) berichtete lediglich von Autoantikörpern gegen α -Synuclein im humanen Serum. Ein Nachweis im Liquor mittels Immuno-Blot in dieser Arbeit fand nicht statt. Reaktive IgG Moleküle gegen Autoantigene in dopaminergen Zellen der SNpc im Hirngewebe von IPS-Patienten wurden allerdings beschrieben (Orr et al. 2005). Auch ließen sich natürliche Autoantikörper gegen A β 42 im Liquor von AD-Patienten und gesunden Probanden nachweisen (Du et al. 2001). Die vorliegenden Ergebnisse schließen das Vorkommen der natürlichen Autoantikörper gegen α -Synuclein im humanen Liquor nicht zwangsläufig aus. Mit der etablierten ELISA Methode war ein sicherer Nachweis allerdings nicht möglich. Weitere Untersuchungen beispielsweise mit Immuno-Präzipitationsassays mit eventuell konzentrierten Liquorproben sind daher zum definitiven Nachweis von Autoantikörpern nötig.

7.2.3 Bewertung der Validität der etablierten Assays für Serum

Die Prüfung der Spezifität bzw. Selektivität des analytischen Verfahrens ist zu Beginn der Etablierung wichtig. Die Existenz natürlicher Autoantikörper gegen α -Synuclein im peripheren Blut ist im Vorfeld der Arbeit nachgewiesen worden (Papachroni et al. 2007) (unveröffentlichte Daten). Der Nachweis der Bindungsspezifität des Autoantikörpers nach affinitätschromatographischer Aufreinigung aus IVIg erfolgte zunächst im Western-Blot. Hier zeigte sich, dass der affinitätsgereinigte IVIg Autoantikörper neben dem Monomer auch niedrig aggregierte α -Synucleinformen (Di- und Trimere) erkannte (Abb. 6). Dies war für den ELISA aus mehreren Gesichtspunkten wichtig. Zunächst war

festzustellen, dass sich nach der Lösung des rekombinant hergestellten α -Synucleins in Wasser augenscheinlich spontan Di- und Trimere bilden könnten. Diese waren trotz des denaturierenden Verfahrens der SDS-Gelelektrophorese im Western-Blot nachweisbar. Es musste daher im Umkehrschluss angenommen werden, dass auch bei der Beschichtung der ELISA Platten mit gelösten α -Synuclein zu einem nicht quantifizierten Prozentsatz Di- und Trimere vorhanden waren. Es bleibt offen, ob der im ELISA bestimmte Serumautoantikörper polyspezifisch analog dem IVIg Autoantikörper alle α -Synucleinformen erkannte oder ob verschiedene Autoantikörper, jeweils spezifisch für Monomer oder höhere Formen, parallel bestimmt wurden. Eine reine Selektivität des ELISA für Autoantikörper gegen das α -Synuclein Monomer, wie ursprünglich angedacht, kann daher nicht angenommen werden.

Soweit mit der Methode beurteilbar, zeigte der affinitätsgereinigte IVIg Autoantikörper ein spezifisches Bindungsverhalten im ELISA (Abb. 16). Die Kreuzreaktivität des affinitätsgereinigten IVIg Autoantikörpers mit β -Synuclein war höchstwahrscheinlich der Homologie zwischen α - und β -Synuclein geschuldet und wurde zuvor schon im Western-Blot nachgewiesen (unveröffentlichte Daten). Beide Proteine weisen in ihrer Aminosäuresequenz eine 61% Übereinstimmung auf (Jakes et al. 1994; Lavedan 1998). Interessanterweise zeigte der affinitätsgereinigte IVIg Autoantikörper keine ausgeprägte unspezifische Bindung an die Polystyrenoerfläche.

Die spezifische Bindung von Autoantikörpern im Serum an beschichtetes α -Synuclein war dagegen schwer direkt zu beurteilen. Spezifität versteht sich hier als die Eigenschaft des Assays den Analyten auch in Gegenwart anderer exogener, wie endogener Komponenten differenziert zu messen (FDA 2009). Das eine absolute Diskriminierung der spezifischen Antikörper-Antigen-Bindung im Serum nicht möglich ist, zeigt das zuvor ausführlich diskutierte Problem der unspezifischen Hintergrundaktivität des Serums und die Tatsache, dass eine Serumprobe absolut frei von Autoantikörpern gegen α -Synuclein von Natur aus nicht zur Verfügung steht. Eine Probe, selektiv frei vom Analyten, stellt die klassische Negativkontrolle in Immuno-Assays dar und erlaubt eine exakte Beurteilung von Matrixeffekten, wie die unspezifische IgG Bindung (Mire-Sluis et al. 2004). Theoretisch ließe sich eine solche Serumprobe mittels der gleichen Affinitätschromatographie, wie für IVIg verwendet, herstellen. Dieser Schritt müsste aber auf Grund der interindividuellen Heterogenität der unspezifischen Bindung mit jeder verwendeten Serumprobe durchgeführt werden und wäre wegen des erheblichen Material- und Arbeitsaufwandes schlichtweg nicht möglich. Ein indirekter Hinweis auf

die Spezifität des Assays ergab sich aber aus der Prüfung der Messgenauigkeit durch Spike-Recovery-Tests (Abb. 18). Unabhängig davon, ob in der Probenmatrix endogen der Analyt vorhanden ist, wurde eine kontrollierte reine Autoantikörpermenge der Probe hinzugefügt und durch die analytische Methode des Assays wieder gefunden (Recovery). Der Spike-Recovery-Test impliziert mit der erfolgreichen Wiederfindung der bekannten Analytenmenge aus der hochkomplexen Probenmatrix neben der Messgenauigkeit auch die Spezifität des Assays. Ein weiterer indirekter Hinweis auf die Spezifität eines indirekten ELISAs kann aus der Beschichtung der Platte mit adäquaten Spezifitätskontrollen gezogen werden. Eine ideale Spezifitätskontrolle müsste ein Protein sein, dass sich in seinen physikalischen und chemischen Eigenschaften dem α -Synuclein ähnelt und keine eigene Antigenität im Serum besitzt. Klaver et al. (2010) nutzten als eine möglichst exakte Kontrolle bei der Beurteilung der Spezifität von IVIg Autoantikörpern gegen A β 42 in einem indirekten ELISA, eine rekombinant hergestellte reverse Form des Peptids, A β 42-1. Eine solche spezifische Negativkontrolle stand für diese Arbeit leider nicht zur Verfügung. Die Beschichtung mit β - und γ -Synuclein ist wegen ihrer eigenen schon genannten Antigenität hinfällig (Papachroni et al. 2007) (unveröffentlichte Daten). Humanes Albumin ist von seiner Struktur dem α -Synuclein zwar gänzlich unterschiedlich, wird aber, wie sich auch im ELISA zeigte (Abb. 16), von eigenen natürlichen Autoantikörpern erkannt (Avrameas 1991). BSA als speziesfremdes Protein dagegen schien keine Antikörperreaktivität im Serum hervorzurufen. Hier zeigte sich die Beschichtung mit BSA zusätzlich blockierend im Vergleich zu unbeschichteten Wells. BSA eignete sich daher gut als Blockierungsprotein. Antikörper gegen BSA sind bislang nur in wenigen Fällen bei Typ1 Diabetes in der Literatur beschrieben worden (Fuchtenbusch et al. 1997). BSA diente zwar gut als Blockierungsprotein, bot aber im Vergleich zu unbeschichteten Wells keinen Vorteil in der Abschätzung des Anteils der unspezifischen Bindung in α -Synuclein Wells.

Im Bezug auf die anderen Validitätskriterien (analytische Sensitivität, Linearität, Genauigkeit und Präzision) kann der etablierte Autoantikörper ELISA als eine verlässliche Nachweismethode bewertet werden. In der Mehrzahl der Fälle weisen Standardkurven bzw. Kalibratoren in Immuno-Assays keine lineare, sondern eine sigmoidale Abnahme auf und Kurvengleichungen zur Konzentrationsbestimmung müssen mittels aufwendigen mathematischen Verfahren angepasst werden (Findlay et al. 2000). Die Absorptionssignale des IVIG Autoantikörpers als Standard wiesen aber über einen weiten Verdünnungsbereich einen linearen und direkt proportionalen Zusammenhang

mit der Konzentration auf (Abb. 11). Der Korrelationskoeffizient r^2 der linearen Regression war größer 0,99 und erfüllte damit das geforderte Mindestmaß (Braggio et al. 1996). Analog zeigte die Absorption bei Serumproben einen linearen Abnahmebereich bei unterschiedlichen Verdünnungen (nicht explizit gezeigt). Die Berechnung der Konzentration des Autoantikörpers im Serum erfolgte aus den Absorptionswerten mit Hilfe der Standardgeradengleichung. Der Nachweis der Verdünnungslinearität für Serum lag im annehmbaren Fehlerbericht von $\pm 20\%$ (Abb. 19 und Tab. 2). Einzig bei der Bestimmung niedriger Konzentrationen nahe der unteren Nachweisgrenze nahm der Fehler zu. Die Intra- und Interassay Präzision zeigte ebenfalls eine akzeptable Abweichung (Tab. 3). Insbesondere die Inter-Assay Präzision von Immuno-Assays ist wegen des Nachweises von Analyten aus komplexen Medien im Vergleich zu chromatographischen Nachweisverfahren schwerer zu kontrollieren (Findlay et al. 2000). In der Literatur wird daher mit einem Variationskoeffizient von bis zu 25% auch ein weniger strenger Akzeptanzbereich für die Unpräzision bei Immuno-Assays vorgeschlagen (Braggio et al. 1996). Eine weitere Steigerung der Präzision eines Assays liegt in der Reproduzierbarkeit der gemessenen Ergebnisse zwischen unterschiedliche versuchsdurchführenden Personen und Laboratorien. Der vorliegende Assay wurde aber für eine einmalige Messung der Konzentration des Autoantikörpers in unterschiedlichen diagnostischen Gruppen etabliert und sollte nur für diese Messung ausreichend validiert sein.

Der Sandwich ELISA zur Quantifizierung des freien α -Synucleins im Serum beruhte auf einem zuvor publizierten Protokoll (Tinsley et al. 2010). Das Protokoll stellte eine Weiterentwicklung der ELISA Methode von Tokuda et al. (2006) für Plasma dar und verwendete zur Optimierung der Signalintensität einen neuen Fängerantikörper (2A7) gegen α -Synuclein. In der Arbeit konnten die Assay Eigenschaften, wie sie von Tinsely et al. (2010) beschrieben wurden, auch für Serum fast vollständig bestätigt werden. Einzig die empfohlene Verwendung von Tween20 1% in PBS wurde wegen der initial guten Ergebnisse in *Spike-Recovery*-Tests bei der Verwendung von reinem PBS als Verdünnungspuffer nicht befolgt (Abb. 22). Bei einem Sandwich ELISA spielt die unspezifische Bindung von Serumbestandteilen, insbesondere humane IgG Moleküle, eine wesentlich kleinere Rolle. Die Detektion des α -Synucleins erfolgte durch eine zweifach spezifische Antigen-Antikörperbindung mit zwei monoklonalen Antikörpern unterschiedlicher Spezies. Wichtig ist hierbei der Ausschluss einer möglichen Kreuzreaktion der beteiligten Antikörper mit Serumkomponenten. Auf eine eingehende Prüfung hierfür

wurde aber wegen der zuvor gut dokumentierten Bindungsspezifität der Antikörper verzichtet (Mollenhauer et al. 2008; Tinsley et al. 2010; Tokuda et al. 2006). Im Rahmen der Etablierung erfolgte nur die Prüfung der Messgenauigkeit und der Präzision zur Gewährleistung der Gültigkeit der später gemessenen Konzentrationen. Beide Kriterien erfüllten die erwartete Norm (Abb. 23 und Tab. 4 und 5).

7.3 Diskussion der Messergebnisse im Serum

7.3.1 Konzentration des natürlichen Autoantikörpers gegen α -Synuclein

Das zentrale Ergebnis der vorliegenden Arbeit war der Nachweis signifikant geringerer Konzentrationen des natürlich vorkommenden Autoantikörpers gegen α -Synuclein im humanen Serum bei Patienten mit IPS im Vergleich zu altersgleichen gesunden Kontrollprobanden und AD-Patienten (Abb. 25). Im Durchschnitt wiesen IPS Patienten gegenüber gesunden Kontrollen eine 32%ige und gegenüber AD-Patienten eine 28%ige niedrigere Konzentration des Autoantikörpers auf. Der Nachweis von Autoantikörpern war im Gegensatz zu den berichteten Western-Blot Ergebnissen von Papachroni et al. (2007) mittels ELISA bei 152 verwendeten individuellen Serumproben in 98% der Fälle möglich gewesen. Die Verwendung des aufgereinigten IVIg Autoantikörpers als Standard erlaubte zudem eine exakte quantitative Beurteilung. Theoretische Schlüsse aus den gemessenen Ergebnissen können nur vor dem Hintergrund der aktuellen Forschung gezogen werden. Es gibt vielfältige Hinweise, dass humorale wie zelluläre Komponenten des Immunsystems im Rahmen einer neuronalen Entzündungsreaktion eine Rolle in der Pathogenese des IPS und anderer Synucleinopathien spielen (Orr et al. 2005). So findet sich eine deutliche Proliferation mikroglialer Zellen in der SNpc und dem Striatum von Parkinsonpatienten, sowie in den Basalganglien experimenteller Tiermodelle für Parkinson (Hunot and Hirsch 2003). Die hoch selektive mikrogliale Entzündungsreaktion der SNpc korreliert zudem mit der klinischen Schwere der Erkrankung und dem Ausmaß der zellulären Degeneration (Ouchi et al. 2005). Microgliazellen können sich funktionell zu Antigen präsentierenden Zellen entwickeln, vermitteln die Aktivierung des klassischen Komplementwegs, induzieren die Opsonisierung beschädigter Neurone und führen zur Chemotaxis anderer Entzündungszellen (Wucherpfennig 1994). Mögliche Konsequenz dieser initialen Immunreaktion könnte eine Veränderung der Permeabilität der Blut-Hirn-Schranke in

den betroffenen Hirnregionen sein und zu einer konsekutiven Infiltration von B- und T-Lymphozyten führen. Letzteres stellt den kritischen Schritt zur Entwicklung einer autoimmunen Reaktion im ZNS dar (Racke et al. 2000). In Hirnschnitten von IPS-Patienten fanden sich gebundene IgG in einem konzentrierten Verteilungsmuster an neuronalen Membranoberflächen und in Kolo-kalisation zu α -Synuclein an Lewy-Körperchen dopaminerger Zellen (Orr et al. 2005). Aktivierte Mikroglia exprimieren den hochaffinen IgG Rezeptor Fc γ RI und zeigen intrazellulär pigmentierte Granula, die einer phagozytären Reaktion auf IgG positive pigmentierte Neurone entsprechen (Orr et al. 2005). Die funktionelle Bedeutung von Antikörpern gegen krankheits-assoziierte neuronale Proteine bleibt bislang ungeklärt. Die stereotaktische Injektion von IgG Fraktionen aus dem Serum von IPS-Patienten in die SNpc von Ratten führte zur Degeneration dopaminerger Zellen (Chen et al. 1998). Es wäre daher plausibel auch Autoantikörpern gegen α -Synuclein ein neurotoxisches Potential zu unterstellen. Dem gegenüber steht allerdings die Erkenntnis aus anderen Experimenten, dass Antikörper gegen bestimmte Proteine in neurodegenerativen Erkrankungen einen verzögernden Effekt auf die Krankheitsprogression haben können. Eine neuroprotektiv wirksame Immunisierung gegen neuronale Antigene durch autoimmune T-Zellen wurde beispielsweise nach schweren Verletzungen des ZNS beobachtet (Moalem et al. 1999). Auch auf die protektive Rolle von natürlich vorkommenden Autoantikörpern gegen A β bei der Alzheimer Demenz wurde bereits ausführlich hingewiesen (siehe Kapitel *Natürliche Autoantikörper bei neurodegenerativen Erkrankungen: Beispiel Alzheimer Demenz*). Ein möglicher neuroprotektiver Effekt von Autoantikörpern gegen α -Synuclein lässt sich an Hand der Arbeit von Masliah et al. (2005) annehmen. Nachdem Mäuse mit humanem α -Synuclein geimpft wurden, produzierten sie hochaffine Antikörper, die eine signifikante Reduktion von aggregierten α -Synucleinformen im neuronalen Gewebe durch lysomalen Abbau bewirkten (Masliah et al. 2005). Natürlich vorkommende Autoantikörper aus IVIg schützten in vitro neuronale Zellkulturen vor dem Einfluss toxischer α -Synuclein Oligomere (unveröffentlichte Daten). Die Autoimmunreaktion gegen α -Synuclein nimmt daher möglicherweise eine physiologische Funktion in der Aufrechterhaltung der Homöostase des Proteins ein. Ein Ungleichgewicht dieser Homöostase könnte zu einer gesteigerten Konzentration des α -Synucleins im Gehirn führen. Wie schon in der Einleitung erwähnt, schafft eine Konzentrierung des α -Synucleins die Bedingung zu seiner eigenen Aggregation und zur Bildung toxischer Oligomere. Autoreaktive IgG könnten daher durch Reduzierung des α -Synucleingehalts in Körperflüssigkeiten schützend wirken. Ein Verlust dieser Wirkung kann im

Umkehrschluss als Risikofaktor für eine α -Synuclein vermittelte neuronale Degeneration im ZNS gelten. Der in der Arbeit nachgewiesene Mangel an α -Synuclein Autoantikörpern im Serum von IPS-Patienten scheint durch den Vergleich zu gesunden Kontrollen und AD-Patienten eine krankheitsspezifische Bedeutung zu haben. Er deutet möglicherweise einen fehlenden Schutz dieser Patienten vor dem toxischen Potential des α -Synucleins an. Da sich allerdings eine erhebliche Überschneidung in der Antikörperkonzentration zwischen IPS-Patienten und den beiden Kontrollgruppen zeigte, ist es wenig wahrscheinlich, dass der Autoantikörpermangel zum unabdingbaren Kern der Pathogenese gehört. Ein Fehlen von protektiven Autoantikörpern könnte eher als ein additiver Risikofaktor für die Erkrankung bewertet werden. Die eigentlichen Gründe für die geringere Konzentration im Serum von IPS-Patienten können theoretisch in einer verminderten Autoantikörperproduktion (1), einem gesteigerten Verbrauch (2) oder in einer Umverteilung aus dem peripheren Blut in das ZNS (3) liegen. Diese Punkte werden im Folgendem diskutiert:

(1) Eine für IPS-Patienten spezifisch verminderte Produktion von natürlichen Autoantikörpern könnte durch eine T-Zell vermittelte humorale und zelluläre Immuntoleranz gegenüber α -Synuclein, wie sie für A β oder das APP bei AD-Patienten postuliert wurde (Monson et al. 2001; Trieb et al. 1996), entstehen. Demnach führt eine chronische Exposition von α -Synuclein im Rahmen der Parkinsonpathologie zu einer verminderten Immunreaktion durch defizitäre, anergische T-Zellen, was konsekutiv eine verminderten Autoantikörperproduktion nach sich zieht und eine weitere Akkumulierung von α -Synuclein fördert. Dabei handelt es sich um eine zeitlich fortschreitende, also im Laufe der Erkrankung auftretende Entwicklung. Bei der Messung der Autoantikörper im Serum konnte allerdings keine weitere Abnahme der Konzentration mit der Dauer der Erkrankung nachgewiesen werden. Möglicherweise waren die untersuchten Fälle in der Krankheitsentwicklung bereits zu weit fortgeschritten (mittleres Erkrankungsalter 10,2 Jahre), als dass sich ein solcher Effekt mit der vorliegenden Studienpopulation abbilden ließe. (2) In einer alternativen Betrachtungsweise könnte die Reduktion der Autoantikörper gegen α -Synuclein auch als eine Konsequenz des zentralen α -Synucleinstoffwechsels bei IPS-Patienten gesehen werden. Analog der *peripheral sink*-Hypothese bei A β (DeMattos et al. 2001) könnten Autoantikörper gegen α -Synuclein im Serum zu einem gesteigerten Efflux von α -Synuclein aus dem ZNS in die periphere Zirkulation führen und den Übertritt von peripheren α -Synuclein in das ZNS durch Bildung von Antikörper-Antigen Komplexen verhindern. Einen indirekten Hinweis dazu

liefert möglicherweise die berichtete Reduktion von löslichem α -Synuclein im Liquor bei IPS-Patienten (Hong et al. 2010). Der Nachweis gesteigerter Konzentrationen des α -Synucleins im peripheren Blut als Folge eines solchen Effluxes konnte dagegen trotz leicht erhöhter Werte in dieser Arbeit nicht sicher erbracht werden (Abb. 30) und bleibt im Allgemeinen wegen der hohen Gefahr der Kontamination der Serumproben mit α -Synuclein aus roten Blutkörperchen schwierig (Shi et al. 2010). Eine Antikörper vermittelte Degradation des α -Synucleins im peripheren Blut könnte konsekutiv zu einem gesteigerten Verbrauch der Autoantikörper bei IPS-Patienten und schließlich zu ihrer verminderten Konzentration im Serum führen. (3) Eine dritte Möglichkeit liegt in der gesteigerten Abwanderung peripherer Autoantikörper in das ZNS selbst, wo sie die α -Synuclein vermittelte Aktivierung der Mikroglia modulieren oder das toxische Potential von extrazellulärem α -Synuclein reduzieren könnten. Hierbei bleibt aber die Frage offen, durch welchen Mechanismus Autoantikörper gegen α -Synuclein die Blut-Hirn-Schranke überwinden. Im Falle der natürlich vorkommenden Autoantikörper gegen A β konnte allerdings eine zentralnervöse Akkumulierung radiomarkierter Autoantikörper nach intranervöser Applikation in Mäusen gezeigt werden (Bacher et al. 2009). Die bislang fehlende Nachweisbarkeit der Autoantikörper gegen α -Synuclein im Liquor (siehe Kapitel *Beurteilung der Autoantikörpermessung im Liquor*) macht eine Beurteilung dieser Hypothese allerdings schwierig.

Summa summarum lassen sich eine Reihe von Erklärungen für die vorliegenden Befunde finden, die wegen der bislang noch fehlenden Forschungsarbeit auf diesem Gebiet aber nur rein spekulativ bleiben können. Zum Zeitpunkt der Fertigstellung der Arbeit fand sich nach ausführlicher *Pubmed* Recherche nur eine weitere neu veröffentlichte Studie, die sich mit der Messung autoreaktiver Antikörper gegen α -Synuclein im humanen Serum beschäftigte (Yanamandra et al. 2011). In dieser Studie wurden die Titer bzw. die Signalintensität autoreaktiver Antikörper gegen das α -Synuclein Monomer, Oligomere und Fibrillen im Serum von Patienten mit IPS und gesunden Kontrollen mittels ELISA und Western-Blot untersucht. Dabei wurden signifikant höhere Antikörpertiter gegen das α -Synuclein Monomer und Fibrillen bei IPS-Patienten als bei den gesunden Kontrollen gefunden, allerdings mit einer Abnahme der Reaktivität mit dem Fortschreiten der Erkrankung (Hoehn und Yahr >2). Die Autoren postulierten daher ebenfalls, dass in der Frühphase des IPS (Hoehn und Yahr 1-2) Autoantikörper im Serum eine protektive Rolle in der Beseitigung des α -Synucleins spielen könnten. Im Zuge der Krankheitsprogression stelle sich allerdings

eine zunehmende T-Zell-Toleranz ein, die sich negativ auf die Antikörperproduktion auswirke und zu einem Missverhältnis in der Proteinbeseitigung führt (Yanamandra et al. 2011). Die geschilderten Beobachtungen verhalten sich allerdings konträr zu den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit im Bezug auf den Vergleich zwischen den diagnostischen Populationen und im Bezug auf die Krankheitsprogression. Weder in der Aufteilung nach Hoehn und Yahr Stadien, noch nach UPDRS Werten, ließ sich ein abnehmender Trend in der Konzentration des Autoantikörpers feststellen (Abb. 27). Dabei ist die von Yanamandra et al. (2011) gewählte Aufteilung in Hoehn und Yahr 1-2 und >2 rein willkürlich und beschreibt formal nur die Schwere des IPS. Eine Aussage über die zeitliche Dimension der Erkrankung kann mit der Hoehn und Yahr Einteilung nur indirekt getroffen werden. Eine Korrelation der Antikörpertiter mit den intervallskalierten UPDRS Werten oder der tatsächlichen Krankheitsdauer in Jahren wurde trotz vorhandener Daten von Yanamandra et al. (2011) nicht durchgeführt. Auch ein methodologischer Kritikpunkt muss hier angebracht werden. Die Autoren kontrollierten in ihrem indirekten ELISA soweit beschrieben nicht den Einfluss unspezifischer Hintergrundaktivität des Serums auf das Absorptionssignal. Wie aber in der vorliegenden Arbeit *in extenso* beschrieben, kann diese Problematik bei der Verwendung von Serum in indirekten Immuno-Assays einen erheblichen Einfluss auf die Spezifität eines Assays haben. In den zugrundeliegenden Protokollen, die Yanamandra et al. nach eigenen Angaben verwendeten, wurde ein Signal aus unbeschichteten Wells oder einer adäquaten Spezifitätskontrolle nicht berücksichtigt (Gruden et al. 2004; Wilhelm et al. 2007). Auch fehlen die Angaben zu weiteren Validierungsexperimenten. Auf der anderen Seite bestätigten Yanamandra et al. (2011) ihre ELISA Ergebnisse mittels Western-Blot Daten. Es bleibt daher schwierig, diese Befunde mit den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit abschließend zu bewerten.

7.3.2 Konzentration des α -Synucleins

Die Bestimmung des α -Synucleins im Serum erbrachte trotz leicht erhöhter Werte im Fall der IPS-Patienten keinen statistisch belegbaren Unterschied (Abb. 30). Vor dem Hintergrund äußerst widersprüchlicher Aussagen über den Gehalt des α -Synucleins im Plasma oder Serum bei IPS-Patienten (Duran et al. 2010; Lee et al. 2006; Li et al. 2007b; Shi et al. 2010) bliebe eine definitive Interpretation jedweder Ergebnisse schwierig. Auf den beträchtlichen Einfluss einer unkontrollierten in-vitro-Hämolyse bei Liquor oder Venenpunktion auf die Konzentration des α -Synucleins wurde erstmalig

durch Shi et al. (2010) und Hong et al. (2010) hingewiesen. Obwohl bekannt ist, dass auch Zellen des hämatopoetischen Systems α -Synuclein exprimieren (Shin et al. 2000) und sich 99% des gesamten α -Synucleins des peripheren Blutes in roten Blutkörperchen befindet (Barbour et al. 2008), wurde der Einfluss einer in-vivo oder in-vitro Hämolyse in den meisten Studien bislang nicht berücksichtigt. Dabei ist offensichtlich, wie leicht die α -Synuclein Konzentration, gemessen in Serum oder Plasma, durch den Grad der Hämolyse (in vivo oder ex vivo) oder Kontamination mit roten Blutkörperchen während der Probenverarbeitung signifikant beeinflusst werden kann. Freies Hämoglobin wird im Allgemeinen als Indikator für die Hämolyse in biologischen Proben verwendet (Lippi et al. 2006b). In der vorliegenden Arbeit wurde allerdings auf die Quantifikation der Hämolyse mittels Hämoglobinmessung verzichtet. Das lässt sich insofern rechtfertigen, als dass es keine allgemeine Empfehlung für einen akzeptablen Messbereich des Hämoglobins in Proben für die Bestimmung von α -Synuclein gibt. Dies hätte für den etablierten ELISA zunächst empirisch durch Zusatz definitiver Mengen lysierter Erythrozyten in einem Serumpool und gleichzeitiger Bestimmung des α -Synuclein- und Hämoglobingehalts evaluiert werden müssen. Letzten Endes wäre die Festlegung eines Schwellenwertes für das Hämoglobin trotz empirischer Bestimmung willkürlich und bleibt wegen der fehlenden Kenntnis über die tatsächliche Verteilung des freien α -Synucleins im Serum von IPS-Patienten kritisch. Die Messung des α -Synucleins wurde daher ohne vorherigen Ausschluss etwaiger Serumproben und damit möglicherweise unter Einbußen der Sensitivität und Spezifität des Assays durchgeführt. Zudem bleibt angesichts der ungleichen Verteilung des α -Synucleins im peripheren Blut die Frage offen, ob freies α -Synuclein im Serum oder Plasma überhaupt oder in Anteilen seinen Ursprung im ZNS nimmt. Da dem monomeren α -Synuclein eine ZNS spezifische „Markierung“ fehlt oder eine solche bislang nicht entdeckt wurde, ist es zukünftig vielversprechender α -Synuclein Spezies mit einer wahrscheinlich hohen ZNS-Spezifität oder mit einer nachgewiesenen Korrelation zur Pathogenese, wie die α -Synuclein Oligomere (El-Agnaf et al. 2006), als Biomarker zu bestimmen.

7.3.3 Natürliche Autoantikörper gegen α -Synuclein als diagnostischer Biomarker

Das Vermögen eines diagnostischen Test zwischen den Zustandsformen „krank“ und „nicht krank“ zu unterscheiden, beinhaltet zum einen seine Fähigkeit tatsächlich Kranke mit einem positiven Testergebnis (Sensitivität) und tatsächlich nicht Kranke mit einem negativen Testergebnis (Spezifität) richtigerweise zu erkennen. Die Zustandsform „nicht krank“ meint zunächst einmal das Fehlen eines IPS und setzte sich in der vorliegenden Arbeit aus neurologisch gesunden Kontrollprobanden und als eine weitere Spezifitätskontrolle aus Patienten mit AD zusammen. Je nach klinischer Fragestellung ergeben sich unterschiedliche Ansprüche an ein Testverfahren. Die Notwendigkeit verlässlicher Biomarker für das IPS wurde schon in der Einleitung diskutiert. Insbesondere für die Früherkennung eines IPS vor dem Hintergrund zukünftiger neuroprotektiver Medikamente bedarf es hoch sensativer Testverfahren, um möglichst alle Patienten zu erkennen und frühzeitig behandeln zu können. Denkbar wären hier einfache Screeningtests, denen sich bei positivem Ergebnis im Rahmen eines sequenziellen Testverfahrens ein aufwendigerer, aber spezifischer Test anschließt. Über die hierzu passende *Parkinson Associated At Risk Study* wurde in der Einleitung schon berichtet (Morley and Hurtig 2010).

Die ROC Analyse ist eines der akkuratesten Verfahren zur Bewertung der Güte eines diagnostischen Tests zwischen zwei definierten Zustandsformen richtig zu unterscheiden (Boyd 1997). Als Kenngröße für die allgemeine Güte des Tests und zum Vergleich zwischen konkurrierenden Testverfahren lässt sich die AUC bestimmen. Nach einer nominell qualitativen Einteilung kann an Hand der AUC ein nicht informativer ($AUC = 0,5$), ein wenig genauer ($0,5 < AUC \leq 0,7$), ein mäßig genauer ($0,7 < AUC \leq 0,9$), ein extrem genauer ($0,9 < AUC \leq 1,0$) und ein perfekter Test ($AUC = 1,0$) unterschieden werden (Swets 1988). Die AUC ist äquivalent zu der Wahrscheinlichkeit, dass ein zufällig gewählter Proband aus der Patientengruppe einen niedrigeren oder höheren Testwert (je nach Definition) als ein zufällig ausgewählter Proband aus der Kontrollgruppe erhält. Ein nicht informativer Test ($AUC = 0,5$) könnte daher bei Vorlage eines kranken und eines nicht kranken Probanden keine größere Wahrscheinlichkeit über das Vorliegen oder das Fehlen der Erkrankung geben, als die Ratewahrscheinlichkeit von 50% (Greiner et al. 2000). Die in der Arbeit etablierte Testmethode erreichte in der Unterscheidung zwischen IPS-Patienten vs. gesunden

Kontrollen und zwischen IPS- vs. AD-Patienten eine AUC von 0,662 bzw. 0,650. Das 95%ige Konfidenzintervall beider Kurven schloss eine Fläche $>0,75$ ein, so dass der vorliegende Test damit eine wenig bis mäßig ausgeprägte Genauigkeit in der globalen Differenzierung der diagnostischen Gruppen aufwies. Der Youden-Index, eine Funktion aus Sensitivität und Spezifität (Youden 1950), ist ein weiterer Marker um die allgemeine Effektivität eines diagnostischen Tests zu beurteilen. Er bestimmt zudem den optimalen Schwellenwert, der das maximale diagnostische Potential des Tests ausnutzt (Schisterman et al. 2005). Der Index nimmt Werte zwischen 0 und 1 an. Werte nahe der 1 deuten eine hohe Effektivität des Tests an, wohingegen Werte nahe der 0 eine limitierte Effektivität in der Diskriminierung der diagnostischen Gruppen bedeuten. Der Youden-Index repräsentiert die maximale vertikale Distanz oder Differenz zwischen der ROC Kurve und der diagonalen Linie (AUC = 0,5 = nicht informativer Test). Er zeigte für die Differenzierung zwischen IPS-Patienten vs. gesunde Kontrollen und IPS- vs. AD-Patienten Werte von 0,31 und 0,28. Als Schwellenwert ergab sich für beide Unterscheidungsfälle eine Konzentration von 46,6 μ g/ml mit einer Sensitivität und Spezifität von 32% und 98% (IPS vs. gesunde Kontrollen). Mit der hohen Spezifität von 98% wies der ELISA ein hohes Vermögen in der korrekten Erkennung (Test negativ: $>46,6\mu$ g/ml) von nicht IPS erkrankten Probanden (gesunde Kontrollen und AD-Patienten) auf. Die hohe Spezifität führte im Umkehrschluss bei einem positiven Testergebnis ($<46,65\mu$ g/ml) zu einer relativ sicheren Erkennung eines IPS (nur 2% falsch positive Testergebnisse). Andererseits wurden durch den relativ niedrigen Schwellenwert 68% der IPS-Patienten nicht vom Test erkannt (falsch negatives Testergebnis). Bei der gleichen Gewichtung von Sensitivität und Spezifität mit einem Schwellenwert von 104,00 μ g/ml ließ sich nur eine mäßige Steigerung der Testsensitivität zu Lasten der Spezifität erreichen (Sensitivität = Spezifität = 61%). Eine willkürliche Festlegung der Sensitivität auf mindestens 85% führte wegen des gegensätzlichen Verhaltens der Testgütekriterien zu einer geringen Spezifität von 26 bzw. 24%. Wie sich mit der mäßigen AUC und dem Youden-Index von ca. 0,30 andeutete, wiesen die diagnostischen Gruppen einen erheblichen Überlappungsbereich in der gemessenen Konzentration des Autoantikörpers auf, was sich negativ auf die allgemeine Testgüte auswirkte. Das geforderte Mindestmaß an Sensitivität und Spezifität von jeweils $>80\%$ (Noelker et al. 2011; Schlossmacher and Mollenhauer 2010) konnte mit der etablierten Messung des natürlichen Autoantikörpers im Serum trotz des nachweisbaren Unterschieds zwischen den Gruppen nicht erreicht werden. Die erhebliche biologische Varianz in der Höhe der Autoantikörperkonzentration zeigte

sich in allen diagnostischen Gruppen. Dieses Phänomen findet sich häufig in initialen Biomarkerstudien und gründet sich möglicherweise auf eine zu unspezifische Messung der relevanten Parameter. Ein Beispiel hierfür ist die Bestimmung des α -Synucleins im Liquor bei IPS-Patienten und Kontrollen. Hier zeigte sich erst bei der Berücksichtigung des Anteils von α -Synuclein Oligomeren an totalen α -Synuclein ein erheblicher Zuwachs in der Testgüte. Bei alleiniger Messung des α -Synuclein Monomers im Liquor mittels Luminex-Assays beschrieben Hong et. al (2010) eine AUC des Testverfahrens von 0,73 mit einer Sensitivität und Spezifität von 93 und 39%. Durch die zusätzliche Bestimmung von α -Synuclein Oligomeren und Berechnung ihres Anteils am totalen α -Synuclein im Liquor mittels ELISA erreichten Tokuda et al. (2010) dagegen eine AUC von 0,95 mit einer Sensitivität und Spezifität von 89 und 91%. Eine ähnliche Steigerung der diagnostischen Trennschärfe ließe sich möglicherweise auch für Autoantikörper gegen α -Synuclein erreichen. Die Autoantikörper sind polyklonal in ihrer Epitoperkennung bezüglich des monomeren α -Synucleins (Papachroni et al. 2007), als auch vermutlich in der Erkennung höher aggregierter α -Synucleinformen. Gerade α -Synuclein Oligomere besitzen, wie schon erwähnt, wahrscheinlich eine ausgesprochen pathogenetische (und spezifische) Bedeutung für das IPS. In der vorliegenden Arbeit wurde eine differenzierte Betrachtung spezifischer Subklone des natürlichen Autoantikörpers gegen bestimmte Bereiche des α -Synuclein Monomers oder der Oligomere bezüglich ihres Vorkommens bei IPS-Patienten und Kontrollen noch nicht durchgeführt. Denkbar wäre hierzu beispielsweise eine differenzierte Beschichtung der ELISA Platte mit α -Synucleinfragmenten, wie der NAC- oder der C-Terminalen-Region, die eine besondere Bedeutung im Aggregationsprozess des Proteins besitzen. Eine Untersuchung von Autoantikörpern gegen oligomere α -Synucleinformen blieb bei der Untersuchung von Yanamandra et al. (2011) allerdings ohne diagnostischen Nutzen. Auch könnte die Kombination mehrerer Biomarker im Serum die diagnostische Güte steigern. Die Bestimmung des freien α -Synucleins im Serum erwies sich hierfür, wie schon erwähnt, als nicht geeignet.

Neben dem diagnostischen Potential wurde in der Arbeit untersucht, in wie weit sich der Autoantikörper als ein Marker der Krankheitsprogression eignet. Leider fand sich weder eine Korrelation zwischen der Dauer (in Jahren) noch der Schwere (Hoehn & Yahr und UPDRS) der Erkrankung mit der Autoantikörperkonzentration. Auf die Problematik der Anwendung der UPDRS als Querschnittswert zur Schwere der Erkrankung wurde bereits hingewiesen. Die Hoehn und Yahr Einteilung könnte zudem

durch die Beurteilung verschiedener Untersucher (Problem der Interrater-Reliabilität s.o.) verzerrt sein. In der Literatur finden sich wenige Studien zu fluiden Biomarkern mit ausreichender Evidenz, die eine Korrelation mit dem klinischen Ausmaß oder der zeitlichen Dauer der Erkrankung zeigten. Zwar wurde von einer inversen Korrelation des α -Synucleins im Liquor mit den Hoehn und Yahr Stadien berichtet (Tokuda et al. 2006), doch ließ sich dies in nachfolgenden größeren Studien nicht bestätigen (Hong et al. 2010). Das Alter der untersuchten Probanden zeigte in allen diagnostischen Gruppen keinen Einfluss auf die Konzentration des Autoantikörpers (Abb. 26), so dass beim Vergleich keine Korrektur auf Alter erfolgen musste. Von einer allgemeinen Zunahme an nachweisbaren autoreaktiven Antikörpern im Alter wurde in einigen Studien berichtet (Candore et al. 1997; Manoussakis et al. 1987). Inwieweit diese Befunde auch auf den natürlichen Autoantikörper gegen α -Synuclein zutreffen, bleibt offen. Die vorliegende Studie umfasste eine Alterskohorte von ca. 60 bis 80 Jahren. Eine genaue Beurteilung des Verlaufs der Autoantikörperkonzentration über die Lebensspanne ließe sich nur unter Ausweitung des untersuchten Altersspektrums erreichen. Da es sich bei der Arbeit um eine Querschnitterhebung handelte, konnte keine Evaluierung des Autoantikörpers als Prognosemarker erfolgen. Hierzu müssten teilnehmende Probanden in regelmäßigen Abständen im Verlauf mehrerer Monate Blut spenden. Die gemessenen Konzentrationen der Autoantikörper ließen sich dann im Krankheitsverlauf prospektiv beurteilen und mit der klinischen Progression korrelieren. Die vorliegende Testvalidierung wurde nicht soweit durchgeführt, als dass sie eine statistisch sichere Reproduzierbarkeit der Ergebnisse über mehrere Monate gewährleisten könnte. Hierfür wären weitere Kontrollen zur Haltbarkeit der verwendeten Materialien, insbesondere zur Konsistenz des gelagerten Standards aus affinitätsgereinigten IVIg Autoantikörpern nötig gewesen.

7.4 Schlussfolgerung

Ziel der vorliegenden Arbeit war die Evaluierung des natürlich vorkommenden Autoantikörpers gegen α -Synuclein als potentiellen Biomarker für das IPS. Hierfür wurde zunächst ein indirekter ELISA zur quantitativen Erfassung der Menge des Autoantikörpers in humanen Serumproben etabliert und nach gängigen laborchemischen Standards validiert. Während der Etablierung zeigte sich das für indirekte Immuno-Assays typische Spezifitätsproblem bei der Analyse komplexer Medien. Der Einfluss

unspezifischer Hintergrundaktivität des Serums wurde unter Einbeziehung methodologischer Literaturempfehlungen diskutiert und für die Messung berücksichtigt. Im Rahmen der Validierung zeigte der Assay eine robuste, verlässliche und schnelle Anwendbarkeit. Parallel zur Assayetablierung erfolgte die Rekrutierung von Patienten bzw. Akquirierung von individuellen Serumproben. Es wurden IPS-Patienten, AD-Patienten und gesunde Kontrollprobanden aus verschiedenen Kliniken in die Studie eingeschlossen. Auf die Probleme der nicht einheitlichen präanalytische Probenverarbeitung und -lagerung wurde hier ausführlich hingewiesen.

Die wesentliche wissenschaftliche Erkenntnis der Arbeit ergab sich aus dem Vergleich der gemessenen Konzentration des natürlichen Autoantikörpers in den diagnostischen Gruppen. Hier zeigte sich eine eindeutige und statistisch gesicherte Reduktion des Autoantikörpers bei IPS-Patienten im Vergleich zu gesunden Probanden und interessanterweise auch im Vergleich zu AD-Patienten. Über die Ursachen der verminderten Autoantikörper können zunächst nur spekulative Aussagen getroffen werden. Verschiedene Thesen, zum Teil in Analogie zu den natürlichen Autoantikörpern gegen A β , die sich in einer ganz ähnlichen Weise bei AD-Patienten verhalten, wurden ausführlich diskutiert. Zukünftige Nachforschungen zur physiologischen Funktion der Autoantikörper werden hierfür genauere Aussagen zulassen. Bei der Untersuchung der Wertigkeit der Autoantikörper als diagnostischer Biomarker wies der Assay nach Bestimmung des Youden-Index eine hohe Spezifität von 98% auf. Allerdings erreichte er nicht das geforderte Mindestmaß von 80% in der diagnostischen Sensitivität. An Hand globaler Vergleichsparameter zeigte der Test leider nur eine mäßige Genauigkeit in der Differenzierung diagnostischer Gruppen. Hier sind differenzierte Messungen spezifischer Subklone des natürlichen Autoantikörpers gegen fragmentierte oder höher aggregierte Formen des α -Synucleins möglicherweise ein vielversprechender Ansatz zur Anhebung der diagnostischen Genauigkeit. Bezogen auf die erhobenen klinisch-epidemiologische Parameter zeigten die natürlich vorkommenden Autoantikörper keine nachweisbare Korrelation. Damit fügt sich der natürlich vorkommende Autoantikörper in die lange Reihe der vorgeschlagenen fluiden Biomarker für das IPS ein, die ebenfalls bislang keine sichere Korrelation mit der Schwere oder Dauer der Erkrankung liefern konnten.

Der etablierte indirekte ELISA kann in seiner jetzigen Form unter Vorkenntnis der bisherigen Arbeit einfach und schnell verändert werden, um den nötigen Bedingungen eines diagnostischen Tests doch noch gerecht zu werden. Die Einfachheit und

Schnelle des Verfahrens, sowie die niedrigen Kosten machen den ELISA nach wie vor zu einem idealen diagnostischen Werkzeug.

ANHANG**MESSDATEN**

Proband	Alter	UPDRS	Hoehn & Yahr	MMSE	Geschlecht	Krankheitsdauer in Jahren	Autoantikörperkonzentration gegen α -Synuclein ($\mu\text{g/ml}$)	α -Synuclein (ng/ml)
IPS-1	58	5	1	30	w	15	88,14	34,52
IPS-2	59	17	1	29	m	5	22,81	12,71
IPS-3	60	20	2	28	m	2	38,68	23,01
IPS-4	60	22	2	30	w	3	106,80	22,20
IPS-5	63	15	1	29	m	10	27,90	22,00
IPS-6	64	13	2	23	m	9	21,65	25,59
IPS-7	65	33	4	26	m	9	10,02	70,08
IPS-8	65	20	2	29	m	14	10,55	18,06
IPS-9	65	10	1	28	m	5	184,11	11,39
IPS-10	66	20	2	30	m	8	78,31	37,32
IPS-11	67	24	2	30	w	5	37,47	10,22
IPS-12	68	19	2	28	w	10	59,51	18,35
IPS-13	68	28	2	29	m	8	76,26	19,91
IPS-14	69	39	3	28	m	6	179,32	14,07
IPS-15	69	21	2	26	w	12	113,72	10,75
IPS-16	69	9	1	28	w	1	30,38	21,55
IPS-17	69	22	2	27	m	5	123,41	24,39
IPS-18	69	12	1	30	m	14	81,04	12,56
IPS-19	70	25	2	11	w	17	86,95	14,85
IPS-20	70	34	3	30	m	15	265,76	21,35
IPS-21	70	39	3	28	w	17	81,54	11,34
IPS-22	71	26	3	30	m	8	102,65	14,02
IPS-23	71	21	2	29	w	6	246,20	17,42
IPS-24	72	27	3	19	w	17	221,38	22,50
IPS-25	72	16	2	29	m	3	175,88	12,51
IPS-26	72	57	4	27	m	8	39,54	13,53
IPS-27	75	51	3	24	m	6	46,48	15,72
IPS-28	76	31	3	28	w	6	113,58	17,70
IPS-29	76	38	4	30	m	9	11,58	18,40
IPS-30	78	54	3	16	w	6	108,77	27,21
IPS-31	78	35	3	21	m	26	113,20	18,74
IPS-32	79	42	3	20	m	2	96,82	11,39
IPS-33	79	23	2	29	m	12	26,99	20,24
IPS-34	80	22	2	30	m	16	10,75	25,90
IPS-35	61	k.A.	1	k.A.	m	5	63,14	k.A.
IPS-36	63	k.A.	1	k.A.	m	6	139,78	k.A.
IPS-37	63	k.A.	2	k.A.	m	8	178,74	k.A.
IPS-38	64	k.A.	1	k.A.	w	8	26,99	k.A.
IPS-39	65	k.A.	1	k.A.	w	7	20,42	k.A.

IPS-40	67	k.A.	2	k.A.	w	8	22,21	k.A.
IPS-41	68	k.A.	2	k.A.	w	12	137,58	k.A.
IPS-42	69	k.A.	2	k.A.	m	12	96,54	k.A.
IPS-43	69	k.A.	1	k.A.	w	4	298,86	k.A.
IPS-44	69	k.A.	2	k.A.	w	19	184,99	k.A.
IPS-45	69	k.A.	3	k.A.	w	28	87,13	k.A.
IPS-46	70	k.A.	2	k.A.	m	6	144,42	k.A.
IPS-47	71	k.A.	2	k.A.	w	9	36,27	k.A.
IPS-48	72	k.A.	2	k.A.	m	9	287,49	k.A.
IPS-49	72	k.A.	4	k.A.	w	9	51,57	k.A.
IPS-50	73	k.A.	2	k.A.	m	11	84,10	k.A.
IPS-51	73	k.A.	2	k.A.	m	8	46,13	k.A.
IPS-52	73	k.A.	3	k.A.	m	13	226,29	k.A.
IPS-53	73	k.A.	3	k.A.	w	11	38,30	k.A.
IPS-54	74	k.A.	2	k.A.	w	10	181,78	k.A.
IPS-55	75	k.A.	2	k.A.	m	10	51,36	k.A.
IPS-56	76	k.A.	5	k.A.	m	9	72,92	k.A.
IPS-57	76	k.A.	3	k.A.	m	13	348,25	k.A.
IPS-58	76	k.A.	3	k.A.	w	27	358,84	k.A.
IPS-59	79	k.A.	3	k.A.	m	18	100,98	k.A.
IPS-60	81	k.A.	2	k.A.	w	4	56,55	k.A.
IPS-61	81	k.A.	2	k.A.	w	9	133,75	k.A.
IPS-62	82	k.A.	2	k.A.	w	22	32,73	k.A.
KO-1	61	k.A.	k.A.	28	m	k.A.	53,39	20,55
KO-2	61	k.A.	k.A.	30	w	k.A.	177,53	11,97
KO-3	62	k.A.	k.A.	29	m	k.A.	61,92	24,16
KO-4	63	k.A.	k.A.	30	w	k.A.	149,65	12,12
KO-5	63	k.A.	k.A.	29	m	k.A.	183,97	25,70
KO-6	64	k.A.	k.A.	29	w	k.A.	71,68	19,33
KO-7	64	k.A.	k.A.	29	m	k.A.	177,10	15,46
KO-8	64	k.A.	k.A.	30	m	k.A.	485,51	42,32
KO-9	65	k.A.	k.A.	30	m	k.A.	111,39	19,29
KO-10	66	k.A.	k.A.	29	m	k.A.	118,24	15,60
KO-11	66	k.A.	k.A.	29	w	k.A.	130,70	12,46
KO-12	66	k.A.	k.A.	29	m	k.A.	179,33	27,07
KO-13	68	k.A.	k.A.	30	m	k.A.	59,21	17,31
KO-14	68	k.A.	k.A.	29	w	k.A.	97,10	10,90
KO-15	68	k.A.	k.A.	28	w	k.A.	108,32	12,31
KO-16	68	k.A.	k.A.	30	w	k.A.	151,62	7,64
KO-17	68	k.A.	k.A.	30	m	k.A.	325,93	11,48
KO-18	69	k.A.	k.A.	29	m	k.A.	99,37	19,64
KO-19	69	k.A.	k.A.	29	m	k.A.	210,69	17,11
KO-20	70	k.A.	k.A.	29	m	k.A.	46,99	13,42
KO-21	70	k.A.	k.A.	29	m	k.A.	55,38	17,67
KO-22	71	k.A.	k.A.	30	w	k.A.	75,01	21,37
KO-23	71	k.A.	k.A.	28	w	k.A.	148,48	24,20
KO-24	72	k.A.	k.A.	30	w	k.A.	39,38	16,35
KO-25	72	k.A.	k.A.	30	w	k.A.	46,82	15,96

KO-26	72	k.A.	k.A.	28	m	k.A.	53,72	23,49
KO-27	72	k.A.	k.A.	30	w	k.A.	247,71	20,06
KO-28	72	k.A.	k.A.	29	m	k.A.	405,41	36,60
KO-29	73	k.A.	k.A.	29	m	k.A.	190,00	23,01
KO-30	73	k.A.	k.A.	30	m	k.A.	217,40	23,65
KO-31	73	k.A.	k.A.	30	w	k.A.	240,39	20,36
KO-32	74	k.A.	k.A.	30	w	k.A.	103,68	9,29
KO-33	74	k.A.	k.A.	30	m	k.A.	144,16	23,01
KO-34	74	k.A.	k.A.	30	w	k.A.	204,90	7,49
KO-35	75	k.A.	k.A.	28	w	k.A.	62,14	14,55
KO-36	75	k.A.	k.A.	30	w	k.A.	163,56	13,09
KO-37	76	k.A.	k.A.	30	m	k.A.	76,97	14,45
KO-38	76	k.A.	k.A.	27	m	k.A.	84,13	17,23
KO-39	76	k.A.	k.A.	29	m	k.A.	104,47	17,78
KO-40	77	k.A.	k.A.	26	m	k.A.	212,06	9,42
KO-41	78	k.A.	k.A.	29	m	k.A.	75,81	8,83
KO-42	78	k.A.	k.A.	29	m	k.A.	122,10	20,91
KO-43	78	k.A.	k.A.	30	w	k.A.	170,89	12,80
KO-44	79	k.A.	k.A.	30	m	k.A.	304,53	11,28
KO-45	79	k.A.	k.A.	29	w	k.A.	439,72	30,14
KO-46	80	k.A.	k.A.	29	w	k.A.	73,75	14,02
AD-1	61	k.A.	k.A.	23	m	k.A.	76,11	15,65
AD-2	62	k.A.	k.A.	21	m	k.A.	60,33	7,51
AD-3	63	k.A.	k.A.	25	w	k.A.	96,35	14,41
AD-4	64	k.A.	k.A.	20	m	k.A.	37,27	13,31
AD-5	64	k.A.	k.A.	21	w	k.A.	96,55	14,61
AD-6	66	k.A.	k.A.	26	m	k.A.	46,13	13,83
AD-7	68	k.A.	k.A.	26	m	k.A.	98,82	8,62
AD-8	68	k.A.	k.A.	27	w	k.A.	141,65	23,99
AD-9	69	k.A.	k.A.	20	m	k.A.	76,11	6,01
AD-10	69	k.A.	k.A.	21	w	k.A.	117,31	11,68
AD-11	69	k.A.	k.A.	24	m	k.A.	211,52	13,44
AD-12	70	k.A.	k.A.	16	w	k.A.	129,86	15,20
AD-13	70	k.A.	k.A.	23	m	k.A.	241,93	17,41
AD-14	71	k.A.	k.A.	28	m	k.A.	114,71	22,10
AD-15	71	k.A.	k.A.	29	m	k.A.	120,67	18,84
AD-16	72	k.A.	k.A.	25	m	k.A.	263,27	16,24
AD-17	73	k.A.	k.A.	30	w	k.A.	63,98	29,40
AD-18	73	k.A.	k.A.	23	w	k.A.	99,84	21,42
AD-19	73	k.A.	k.A.	13	w	k.A.	131,51	34,02
AD-20	73	k.A.	k.A.	19	w	k.A.	137,86	13,05
AD-21	73	k.A.	k.A.	20	w	k.A.	251,61	11,92
AD-22	73	k.A.	k.A.	14	m	k.A.	493,03	21,65
AD-23	74	k.A.	k.A.	24	m	k.A.	43,97	14,48
AD-24	74	k.A.	k.A.	12	w	k.A.	126,60	8,16
AD-25	74	k.A.	k.A.	23	w	k.A.	240,46	20,41
AD-26	75	k.A.	k.A.	21	w	k.A.	114,29	16,37
AD-27	76	k.A.	k.A.	8	w	k.A.	46,20	16,56

AD-28	76	k.A.	k.A.	22	m	k.A.	79,73	75,20
AD-29	76	k.A.	k.A.	18	m	k.A.	213,18	22,56
AD-30	76	k.A.	k.A.	27	w	k.A.	277,39	11,29
AD-31	77	k.A.	k.A.	21	m	k.A.	54,58	24,84
AD-32	78	k.A.	k.A.	14	m	k.A.	65,83	23,21
AD-33	78	k.A.	k.A.	19	m	k.A.	113,64	11,92
AD-34	78	k.A.	k.A.	24	m	k.A.	141,49	20,47
AD-35	79	k.A.	k.A.	24	m	k.A.	164,17	15,65
AD-36	79	k.A.	k.A.	20	w	k.A.	289,14	19,86
AD-37	79	k.A.	k.A.	14	m	k.A.	424,64	10,24
AD-38	80	k.A.	k.A.	25	w	k.A.	105,64	18,06
AD-39	80	k.A.	k.A.	20	w	k.A.	168,04	22,94
AD-40	81	k.A.	k.A.	22	w	k.A.	74,02	18,74
AD-41	81	k.A.	k.A.	23	w	k.A.	128,40	24,20
AD-42	83	k.A.	k.A.	26	w	k.A.	110,34	13,44

LITERATURVERZEICHNIS

- Aarsland D, Ballard CG, Halliday G. 2004. Are Parkinson's disease with dementia and dementia with Lewy bodies the same entity? *J Geriatr Psychiatry Neurol* 17(3):137-145.
- Abeliovich A, Schmitz Y, Farinas I, Choi-Lundberg D, Ho WH, Castillo PE, Shinsky N, Verdugo JM, Armanini M, Ryan A, Hynes M, Phillips H, Sulzer D, Rosenthal A. 2000. Mice lacking alpha-synuclein display functional deficits in the nigrostriatal dopamine system. *Neuron* 25(1):239-252.
- Ahn BH, Rhim H, Kim SY, Sung YM, Lee MY, Choi JY, Wolozin B, Chang JS, Lee YH, Kwon TK, Chung KC, Yoon SH, Hahn SJ, Kim MS, Jo YH, Min DS. 2002. alpha-Synuclein interacts with phospholipase D isozymes and inhibits pervanadate-induced phospholipase D activation in human embryonic kidney-293 cells. *J Biol Chem* 277(14):12334-12342.
- Akerstrom B, Bjorck L. 1986. A physicochemical study of protein G, a molecule with unique immunoglobulin G-binding properties. *J Biol Chem* 261(22):10240-10247.
- Alves G, Bronnick K, Aarsland D, Blennow K, Zetterberg H, Ballard C, Kurz MW, Andreasson U, Tysnes OB, Larsen JP, Mulugeta E. 2010. CSF amyloid-beta and tau proteins, and cognitive performance, in early and untreated Parkinson's disease: the Norwegian ParkWest study. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 81(10):1080-1086.
- Apetri MM, Maiti NC, Zagorski MG, Carey PR, Anderson VE. 2006. Secondary structure of alpha-synuclein oligomers: characterization by raman and atomic force microscopy. *J Mol Biol* 355(1):63-71.
- Auluck PK, Caraveo G, Lindquist S. 2010. alpha-Synuclein: membrane interactions and toxicity in Parkinson's disease. *Annu Rev Cell Dev Biol* 26:211-233.
- Avrameas S. 1991. Natural autoantibodies: from 'horror autotoxicus' to 'gnosthi seauton'. *Immunol Today* 12(5):154-159.
- Avrameas S, Guilbert B. 1971. A method for quantitative determination of cellular immunoglobulins by enzyme-labeled antibodies. *Eur J Immunol* 1(5):394-396.
- Baccala R, Quang TV, Gilbert M, Ternynck T, Avrameas S. 1989. Two murine natural polyreactive autoantibodies are encoded by nonmutated germ-line genes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 86(12):4624-4628.
- Bach JP, Dodel R, Oertel W. 2010. Parkinsonsyndrome. In: Dodel R. (Hrsg.) *Lehrbuch Neurologie: ihr roter Faden durchs Studium nach der neuen ÄAppO*. Stuttgart: Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft. S. 350-373
- Bacher M, Depboylu C, Du Y, Noelker C, Oertel WH, Behr T, Henriksen G, Behe M, Dodel R. 2009. Peripheral and central biodistribution of (111)In-labeled anti-beta-amyloid autoantibodies in a transgenic mouse model of Alzheimer's disease. *Neurosci Lett* 449(3):240-245.
- Ballard C, Gauthier S, Corbett A, Brayne C, Aarsland D, Jones E. 2011. Alzheimer's disease. *Lancet* 377(9770):1019-1031.

- Barbour R, Kling K, Anderson JP, Banducci K, Cole T, Diep L, Fox M, Goldstein JM, Soriano F, Seubert P, Chilcote TJ. 2008. Red blood cells are the major source of alpha-synuclein in blood. *Neurodegener Dis* 5(2):55-59.
- Bard F, Cannon C, Barbour R, Burke RL, Games D, Grajeda H, Guido T, Hu K, Huang J, Johnson-Wood K, Khan K, Kholodenko D, Lee M, Lieberburg I, Motter R, Nguyen M, Soriano F, Vasquez N, Weiss K, Welch B, Seubert P, Schenk D, Yednock T. 2000. Peripherally administered antibodies against amyloid beta-peptide enter the central nervous system and reduce pathology in a mouse model of Alzheimer disease. *Nat Med* 6(8):916-919.
- Bartels T, Choi JG, Selkoe DJ. 2011. alpha-Synuclein occurs physiologically as a helically folded tetramer that resists aggregation. *Nature* 477(7362):107-110.
- Bassetti CL. 2010. Nonmotor disturbances in Parkinson's disease. *Neurodegener Dis* 8(3):95-108.
- Baumgarth N, Tung JW, Herzenberg LA. 2005. Inherent specificities in natural antibodies: a key to immune defense against pathogen invasion. *Springer Semin Immunopathol* 26(4):347-362.
- Bergmeyer HU. 1983. *Methods of Enzymatic Analysis: Fundamentals*. Bergmeyer HU, editor. Weinheim: Verlag Chemie GmbH.
- Bernheimer H, Birkmayer W, Hornykiewicz O, Jellinger K, Seitelberger F. 1973. Brain dopamine and the syndromes of Parkinson and Huntington. Clinical, morphological and neurochemical correlations. *J Neurol Sci* 20(4):415-455.
- Betz JM, Brown PN, Roman MC. 2011. Accuracy, precision, and reliability of chemical measurements in natural products research. *Fitoterapia* 82(1):44-52.
- Biomarkers Definitions Working Group. 2001. Biomarkers and surrogate endpoints: preferred definitions and conceptual framework. *Clin Pharmacol Ther* 69(3):89-95.
- Boeve BF, Silber MH, Saper CB, Ferman TJ, Dickson DW, Parisi JE, Benarroch EE, Ahlskog JE, Smith GE, Caselli RC, Tippman-Peikert M, Olson EJ, Lin SC, Young T, Wszolek Z, Schenck CH, Mahowald MW, Castillo PR, Del Tredici K, Braak H. 2007. Pathophysiology of REM sleep behaviour disorder and relevance to neurodegenerative disease. *Brain* 130(Pt 11):2770-2788.
- Bogdanov M, Matson WR, Wang L, Matson T, Saunders-Pullman R, Bressman SS, Flint Beal M. 2008. Metabolomic profiling to develop blood biomarkers for Parkinson's disease. *Brain* 131(Pt 2):389-396.
- Bolelli G, Muti P, Micheli A, Sciajno R, Franceschetti F, Krogh V, Pisani P, Berrino F. 1995. Validity for epidemiological studies of long-term cryoconservation of steroid and protein hormones in serum and plasma. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 4(5):509-513.
- Bonini P, Plebani M, Ceriotti F, Rubboli F. 2002. Errors in laboratory medicine. *Clin Chem* 48(5):691-698.
- Borghi R, Marchese R, Negro A, Marinelli L, Forloni G, Zaccheo D, Abbruzzese G, Tabaton M. 2000. Full length alpha-synuclein is present in cerebrospinal fluid from Parkinson's disease and normal subjects. *Neurosci Lett* 287(1):65-67.

- Bostantjopoulou S, Katsarou Z, Papadimitriou A, Veletza V, Hatzigeorgiou G, Lees A. 2001. Clinical features of parkinsonian patients with the alpha-synuclein (G209A) mutation. *Mov Disord* 16(6):1007-1013.
- Bouvet JP, Stahl D, Rose S, Quan CP, Kazatchkine MD, Kaveri SV. 2001. Induction of natural autoantibody activity following treatment of human immunoglobulin with dissociating agents. *J Autoimmun* 16(2):163-172.
- Boyd JC. 1997. Mathematical tools for demonstrating the clinical usefulness of biochemical markers. *Scand J Clin Lab Invest Suppl* 227:46-63.
- Braak H, Del Tredici K. 2008. Invited Article: Nervous system pathology in sporadic Parkinson disease. *Neurology* 70(20):1916-1925.
- Braak H, Del Tredici K, Rub U, de Vos RA, Jansen Steur EN, Braak E. 2003. Staging of brain pathology related to sporadic Parkinson's disease. *Neurobiol Aging* 24(2):197-211.
- Braak H, Sandmann-Keil D, Gai W, Braak E. 1999. Extensive axonal Lewy neurites in Parkinson's disease: a novel pathological feature revealed by alpha-synuclein immunocytochemistry. *Neurosci Lett* 265(1):67-69.
- Braggio S, Barnaby RJ, Grossi P, Cugola M. 1996. A strategy for validation of bioanalytical methods. *J Pharm Biomed Anal* 14(4):375-388.
- Breen DP, Michell AW, Barker RA. 2011. Parkinson's disease--the continuing search for biomarkers. *Clin Chem Lab Med* 49(3):393-401.
- Brettschneider S, Morgenthaler NG, Teipel SJ, Fischer-Schulz C, Burger K, Dodel R, Du Y, Moller HJ, Bergmann A, Hampel H. 2005. Decreased serum amyloid beta(1-42) autoantibody levels in Alzheimer's disease, determined by a newly developed immuno-precipitation assay with radiolabeled amyloid beta(1-42) peptide. *Biol Psychiatry* 57(7):813-816.
- Bronstein J, Carvey P, Chen H, Cory-Slechta D, DiMonte D, Duda J, English P, Goldman S, Grate S, Hansen J, Hoppin J, Jewell S, Kamel F, Koroshetz W, Langston JW, Logroscino G, Nelson L, Ravina B, Rocca W, Ross GW, Schettler T, Schwarzschild M, Scott B, Seegal R, Singleton A, Steenland K, Tanner CM, Van Den Eeden S, Weisskopf M. 2009. Meeting report: consensus statement-Parkinson's disease and the environment: collaborative on health and the environment and Parkinson's Action Network (CHE PAN) conference 26-28 June 2007. *Environ Health Perspect* 117(1):117-121.
- Brucale M, Sandal M, Di Maio S, Rampioni A, Tessari I, Tosatto L, Bisaglia M, Bubacco L, Samori B. 2009. Pathogenic mutations shift the equilibria of alpha-synuclein single molecules towards structured conformers. *Chembiochem* 10(1):176-183.
- Brundin P, Barker RA, Parmar M. 2010. Neural grafting in Parkinson's disease Problems and possibilities. *Prog Brain Res* 184:265-294.
- Burnet FM. 1976. A modification of Jerne's theory of antibody production using the concept of clonal selection. *CA Cancer J Clin* 26(2):119-121.
- Buter TC, van den Hout A, Matthews FE, Larsen JP, Brayne C, Aarsland D. 2008. Dementia and survival in Parkinson disease: a 12-year population study. *Neurology* 70(13):1017-1022.
- Candore G, Di Lorenzo G, Mansueto P, Melluso M, Frada G, Li Vecchi M, Esposito Pellitteri M, Drago A, Di Salvo A, Caruso C. 1997. Prevalence of organ-specific

- and non organ-specific autoantibodies in healthy centenarians. *Mech Ageing Dev* 94(1-3):183-190.
- Carraro P, Plebani M. 2007. Errors in a stat laboratory: types and frequencies 10 years later. *Clin Chem* 53(7):1338-1342.
- Caudle WM, Colebrooke RE, Emson PC, Miller GW. 2008. Altered vesicular dopamine storage in Parkinson's disease: a premature demise. *Trends Neurosci* 31(6):303-308.
- Ceballos-Baumann AO. 2006. Idiopathisches Parkinson-Syndrom (IPS). In: Berlit P (Hrsg.). *Klinische Neurologie*. 2. aktualisierte Auflage. Heidelberg: Springer Medizin Verlag. S. 852-871.
- Chaigneau C, Cabioch T, Beaumont K, Betsou F. 2007. Serum biobank certification and the establishment of quality controls for biological fluids: examples of serum biomarker stability after temperature variation. *Clin Chem Lab Med* 45(10):1390-1395.
- Chartier-Harlin MC, Kachergus J, Roumier C, Mouroux V, Douay X, Lincoln S, Levecque C, Larvor L, Andrieux J, Hulihan M, Waucquier N, Defebvre L, Amouyel P, Farrer M, Destee A. 2004. Alpha-synuclein locus duplication as a cause of familial Parkinson's disease. *Lancet* 364(9440):1167-1169.
- Chaudhuri KR, Odin P, Antonini A, Martinez-Martin P. 2011. Parkinson's disease: The non-motor issues. *Parkinsonism Relat Disord*.
- Chen C, Stenzel-Poore MP, Rittenberg MB. 1991. Natural auto- and polyreactive antibodies differing from antigen-induced antibodies in the H chain CDR3. *J Immunol* 147(7):2359-2367.
- Chen S, Le WD, Xie WJ, Alexianu ME, Engelhardt JI, Siklos L, Appel SH. 1998. Experimental destruction of substantia nigra initiated by Parkinson disease immunoglobulins. *Arch Neurol* 55(8):1075-1080.
- Cheng HM. 1996. Tween 20 selectively enhances naturally occurring anticardiolipin antibody binding in ELISA procedures. *J Immunol Methods* 191(1):87-91.
- Compta Y, Marti MJ, Ibarretxe-Bilbao N, Junque C, Valldeoriola F, Munoz E, Ezquerra M, Rios J, Tolosa E. 2009. Cerebrospinal tau, phospho-tau, and beta-amyloid and neuropsychological functions in Parkinson's disease. *Mov Disord* 24(15):2203-2210.
- Conway KA, Lee SJ, Rochet JC, Ding TT, Williamson RE, Lansbury PT, Jr. 2000. Acceleration of oligomerization, not fibrillization, is a shared property of both alpha-synuclein mutations linked to early-onset Parkinson's disease: implications for pathogenesis and therapy. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97(2):571-576.
- Cowchock S, Fort J, Munoz S, Norberg R, Maddrey W. 1988. False positive ELISA tests for anticardiolipin antibodies in sera from patients with repeated abortion, rheumatologic disorders and primary biliary cirrhosis: correlation with elevated polyclonal IgM and implications for patients with repeated abortion. *Clin Exp Immunol* 73(2):289-294.
- Crowther JR. 1995. *ELISA: theory and practice*. Totowa, New Jersey: Humana Press Inc.
- Crowther JR. 2001. *The ELISA Guidebook*. Totowa, New Jersey: Humana Press Inc.

- Davidson WS, Jonas A, Clayton DF, George JM. 1998. Stabilization of alpha-synuclein secondary structure upon binding to synthetic membranes. *J Biol Chem* 273(16):9443-9449.
- De Gruttola VG, Clax P, DeMets DL, Downing GJ, Ellenberg SS, Friedman L, Gail MH, Prentice R, Wittes J, Zeger SL. 2001. Considerations in the evaluation of surrogate endpoints in clinical trials. summary of a National Institutes of Health workshop. *Control Clin Trials* 22(5):485-502.
- Del Tredici K, Hawkes CH, Ghebremedhin E, Braak H. 2010. Lewy pathology in the submandibular gland of individuals with incidental Lewy body disease and sporadic Parkinson's disease. *Acta Neuropathol* 119(6):703-713.
- DeMattos RB, Bales KR, Cummins DJ, Dodart JC, Paul SM, Holtzman DM. 2001. Peripheral anti-A beta antibody alters CNS and plasma A beta clearance and decreases brain A beta burden in a mouse model of Alzheimer's disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98(15):8850-8855.
- Desplats P, Lee HJ, Bae EJ, Patrick C, Rockenstein E, Crews L, Spencer B, Masliah E, Lee SJ. 2009. Inclusion formation and neuronal cell death through neuron-to-neuron transmission of alpha-synuclein. *Proc Natl Acad Sci USA* 106(31):13010-13015.
- Devic I, Hwang H, Edgar JS, Izutsu K, Presland R, Pan C, Goodlett DR, Wang Y, Armaly J, Tumas V, Zabetian CP, Leverenz JB, Shi M, Zhang J. 2011. Salivary alpha-synuclein and DJ-1: potential biomarkers for Parkinson's disease. *Brain* 134(Pt 7):e178.
- Dickson DW, Braak H, Duda JE, Duyckaerts C, Gasser T, Halliday GM, Hardy J, Leverenz JB, Del Tredici K, Wszolek ZK, Litvan I. 2009. Neuropathological assessment of Parkinson's disease: refining the diagnostic criteria. *Lancet Neurol* 8(12):1150-1157.
- Dimitrov JD, Lacroix-Desmazes S, Kaveri SV, Vassilev TL. 2007. Transition towards antigen-binding promiscuity of a monospecific antibody. *Mol Immunol* 44(8):1854-1863.
- Djoumerska I, Tchorbanov A, Pashov A, Vassilev T. 2005. The autoreactivity of therapeutic intravenous immunoglobulin (IVIG) preparations depends on the fractionation methods used. *Scand J Immunol* 61(4):357-363.
- Dodel R, Balakrishnan K, Keyvani K, Deuster O, Neff F, Andrei-Selmer LC, Roskam S, Stuer C, Al-Abed Y, Noelker C, Balzer-Geldsetzer M, Oertel W, Du Y, Bacher M. 2011. Naturally occurring autoantibodies against beta-amyloid: investigating their role in transgenic animal and in vitro models of Alzheimer's disease. *J Neurosci* 31(15):5847-5854.
- Dodel R, Hampel H, Depboylu C, Lin S, Gao F, Schock S, Jackel S, Wei X, Buerger K, Hoft C, Hemmer B, Moller HJ, Farlow M, Oertel WH, Sommer N, Du Y. 2002. Human antibodies against amyloid beta peptide: a potential treatment for Alzheimer's disease. *Ann Neurol* 52(2):253-256.
- Dodel R, Neff F, Noelker C, Pul R, Du Y, Bacher M, Oertel W. 2010. Intravenous immunoglobulins as a treatment for Alzheimer's disease: rationale and current evidence. *Drugs* 70(5):513-528.
- Dodel R, Du Y, Depboylu C, Hampel H, Frolich L, Haag A, Hemmeter U, Paulsen S, Teipel SJ, Brettschneider S, Spottke A, Nolker C, Moller HJ, Wei X, Farlow M,

- Sommer N, Oertel WH. 2004. Intravenous immunoglobulins containing antibodies against beta-amyloid for the treatment of Alzheimer's disease. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 75(10):1472-1474.
- Double KL, Rowe DB, Carew-Jones FM, Hayes M, Chan DK, Blackie J, Corbett A, Joffe R, Fung VS, Morris J, Riederer P, Gerlach M, Halliday GM. 2009. Anti-melanin antibodies are increased in sera in Parkinson's disease. *Exp Neurol* 217(2):297-301.
- Du Y, Dodel R, Hampel H, Buerger K, Lin S, Eastwood B, Bales K, Gao F, Moeller HJ, Oertel W, Farlow M, Paul S. 2001. Reduced levels of amyloid beta-peptide antibody in Alzheimer disease. *Neurology* 57(5):801-805.
- Du Y, Wei X, Dodel R, Sommer N, Hampel H, Gao F, Ma Z, Zhao L, Oertel WH, Farlow M. 2003. Human anti-beta-amyloid antibodies block beta-amyloid fibril formation and prevent beta-amyloid-induced neurotoxicity. *Brain* 126(Pt 9):1935-1939.
- Duda JE, Giasson BI, Chen Q, Gur TL, Hurtig HI, Stern MB, Gollomp SM, Ischiropoulos H, Lee VM, Trojanowski JQ. 2000. Widespread nitration of pathological inclusions in neurodegenerative synucleinopathies. *Am J Pathol* 157(5):1439-1445.
- Duran R, Barrero FJ, Morales B, Luna JD, Ramirez M, Vives F. 2010. Plasma alpha-synuclein in patients with Parkinson's disease with and without treatment. *Mov Disord* 25(4):489-493.
- Eggert KM, Oertel WH. 2008. Leitlinie Parkinson-Syndrom Diagnostik und Therapie / hrsg. von der Expertengruppe des Kompetenznetz Parkinson. Teilausg. von: Diener, H. C.: Leitlinien für Diagnostik und Therapie in der Neurologie. Stuttgart: Georg Thieme Verlag.
- El-Agnaf OM, Salem SA, Paleologou KE, Cooper LJ, Fullwood NJ, Gibson MJ, Curran MD, Court JA, Mann DM, Ikeda S, Cookson MR, Hardy J, Allsop D. 2003. Alpha-synuclein implicated in Parkinson's disease is present in extracellular biological fluids, including human plasma. *FASEB J* 17(13):1945-1947.
- El-Agnaf OM, Salem SA, Paleologou KE, Curran MD, Gibson MJ, Court JA, Schlossmacher MG, Allsop D. 2006. Detection of oligomeric forms of alpha-synuclein protein in human plasma as a potential biomarker for Parkinson's disease. *FASEB J* 20(3):419-425.
- Elbaz A, Bower JH, Peterson BJ, Maraganore DM, McDonnell SK, Ahlskog JE, Schaid DJ, Rocca WA. 2003. Survival study of Parkinson disease in Olmsted County, Minnesota. *Arch Neurol* 60(1):91-96.
- Elkon K, Casali P. 2008. Nature and functions of autoantibodies. *Nat Clin Pract Rheumatol* 4(9):491-498.
- Eller M, Williams DR. 2009. Biological fluid biomarkers in neurodegenerative parkinsonism. *Nat Rev Neurol* 5(10):561-570.
- Engvall E, Perlmann P. 1971. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Quantitative assay of immunoglobulin G. *Immunochemistry* 8(9):871-874.
- Engvall E, Perlmann P. 1972. Enzyme-linked immunosorbent assay, Elisa. 3. Quantitation of specific antibodies by enzyme-labeled anti-immunoglobulin in antigen-coated tubes. *J Immunol* 109(1):129-135.

- Eriksen JL, Przedborski S, Petrucelli L. 2005. Gene dosage and pathogenesis of Parkinson's disease. *Trends Mol Med* 11(3):91-96.
- Fahn S. 2003. Description of Parkinson's disease as a clinical syndrome. *Ann N Y Acad Sci* 991:1-14.
- Fahn S, Elton R, UPDRS pm. 1987. Unified Parkinsons Disease Rating Scale. In: Fahn S, Marsden C, Goldstein M, Calne D, editors. *Recent developments in Parkinson's disease*. Florham Park, NJ: Macmillan Healthcare Information. p 153-163.
- FDA. 2005. Guidance for Industry: Pharmacogenomic Data Submissions. U.S. Department of Health and Human Services (Hrsg.). Rockville: Food and Drug Administration (FDA).
<http://www.fda.gov/downloads/Drugs/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/Guidances/ucm079849.pdf> (Zugriff am 08.09.2011)
- FDA. 2009. Guidance for Industry: Guidances for the Validation of Analytical Methods Used in Residue Depletion Studies. U.S. Department of Health and Human Services (Hrsg.). Rockville: Food and Drug Administration (FDA).
<http://www.fda.gov/downloads/AnimalVeterinary/GuidanceComplianceEnforcement/GuidanceforIndustry/UCM207942.pdf> (Zugriff am 08.09.2011)
- Fearnley JM, Lees AJ. 1991. Ageing and Parkinson's disease: substantia nigra regional selectivity. *Brain* 114 (Pt 5):2283-2301.
- Findlay JW, Smith WC, Lee JW, Nordblom GD, Das I, DeSilva BS, Khan MN, Bowsher RR. 2000. Validation of immunoassays for bioanalysis: a pharmaceutical industry perspective. *J Pharm Biomed Anal* 21(6):1249-1273.
- Flower L, Ahuja RH, Humphries SE, Mohamed-Ali V. 2000. Effects of sample handling on the stability of interleukin 6, tumour necrosis factor-alpha and leptin. *Cytokine* 12(11):1712-1716.
- Folstein MF, Folstein SE, McHugh PR. 1975. "Mini-mental state". A practical method for grading the cognitive state of patients for the clinician. *J Psychiatr Res* 12(3):189-198.
- Fuchtenbusch M, Karges W, Standl E, Dosch HM, Ziegler AG. 1997. Antibodies to bovine serum albumin (BSA) in type 1 diabetes and other autoimmune disorders. *Exp Clin Endocrinol Diabetes* 105(2):86-91.
- Fujii K, Tsuji M, Murota K, Terato K, Shimozuru Y, Nagai Y. 1989. An improved enzyme-linked immunosorbent assay of anti-collagen antibodies in human serum. *J Immunol Methods* 124(1):63-70.
- Fujiwara H, Hasegawa M, Dohmae N, Kawashima A, Masliah E, Goldberg MS, Shen J, Takio K, Iwatsubo T. 2002. alpha-Synuclein is phosphorylated in synucleinopathy lesions. *Nat Cell Biol* 4(2):160-164.
- Gagne JJ, Power MC. 2010. Anti-inflammatory drugs and risk of Parkinson disease: a meta-analysis. *Neurology* 74(12):995-1002.
- Gao YC, Yuan ZB, Yang YD, Lu HK. 2007. Effect of freeze-thaw cycles on serum measurements of AFP, CEA, CA125 and CA19-9. *Scand J Clin Lab Invest* 67(7):741-747.
- Gasser T. 2009. Molecular pathogenesis of Parkinson disease: insights from genetic studies. *Expert Rev Mol Med* 11:e22.

- George JM, Jin H, Woods WS, Clayton DF. 1995. Characterization of a novel protein regulated during the critical period for song learning in the zebra finch. *Neuron* 15(2):361-372.
- Giasson BI, Murray IV, Trojanowski JQ, Lee VM. 2001. A hydrophobic stretch of 12 amino acid residues in the middle of alpha-synuclein is essential for filament assembly. *J Biol Chem* 276(4):2380-2386.
- Gibb WR. 1988. Accuracy in the clinical diagnosis of parkinsonian syndromes. *Postgrad Med J* 64(751):345-351.
- Gibb WR, Lees AJ. 1988. The relevance of the Lewy body to the pathogenesis of idiopathic Parkinson's disease. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 51(6):745-752.
- Gislefoss RE, Grimsrud TK, Morkrid L. 2008. Long-term stability of serum components in the Janus Serum Bank. *Scand J Clin Lab Invest* 68(5):402-409.
- Goetz CG. 1986. Charcot on Parkinson's disease. *Mov Disord* 1(1):27-32.
- Goetz CG, Poewe W, Rascol O, Sampaio C, Stebbins GT, Counsell C, Giladi N, Holloway RG, Moore CG, Wenning GK, Yahr MD, Seidl L, Movement Disorder Society Task Force on Rating Scales for Parkinson's D. 2004. Movement Disorder Society Task Force report on the Hoehn and Yahr staging scale: status and recommendations. *Mov Disord* 19(9):1020-1028.
- Goetz CG, Stebbins GT, Chmura TA, Fahn S, Klawans HL, Marsden CD. 1995. Teaching tape for the motor section of the unified Parkinson's disease rating scale. *Mov Disord* 10(3):263-266.
- Goldberg MS, Lansbury PT, Jr. 2000. Is there a cause-and-effect relationship between alpha-synuclein fibrillization and Parkinson's disease? *Nat Cell Biol* 2(7):E115-119.
- Gosavi N, Lee HJ, Lee JS, Patel S, Lee SJ. 2002. Golgi fragmentation occurs in the cells with prefibrillar alpha-synuclein aggregates and precedes the formation of fibrillar inclusion. *J Biol Chem* 277(50):48984-48992.
- Granieri E, Carreras M, Casetta I, Govoni V, Tola MR, Paolino E, Monetti VC, De Bastiani P. 1991. Parkinson's disease in Ferrara, Italy, 1967 through 1987. *Arch Neurol* 48(8):854-857.
- Greffard S, Verny M, Bonnet A, Seilhean D, Hauw J, Duyckaerts C. 2008. The proportion of neurons containing Lewy bodies remains stable with time in the substantia nigra. A proposed model of neuronal death in relation to Lewy bodies. *Clin Neuropathol* 27:179.
- Greiner M, Pfeiffer D, Smith RD. 2000. Principles and practical application of the receiver-operating characteristic analysis for diagnostic tests. *Prev Vet Med* 45(1-2):23-41.
- Greiner M, Sohr D, Gobel P. 1995. A modified ROC analysis for the selection of cut-off values and the definition of intermediate results of serodiagnostic tests. *J Immunol Methods* 185(1):123-132.
- Gruden MA, Davudova TB, Malisauskas M, Zamotin VV, Sewell RD, Voskresenskaya NI, Kostanyan IA, Sherstnev VV, Morozova-Roche LA. 2004. Autoimmune responses to amyloid structures of Abeta(25-35) peptide and human lysozyme in the serum of patients with progressive Alzheimer's disease. *Dement Geriatr Cogn Disord* 18(2):165-171.

- Haehner A, Hummel T, Hummel C, Sommer U, Junghanns S, Reichmann H. 2007. Olfactory loss may be a first sign of idiopathic Parkinson's disease. *Mov Disord* 22(6):839-842.
- Hanley JA, McNeil BJ. 1982. The meaning and use of the area under a receiver operating characteristic (ROC) curve. *Radiology* 143(1):29-36.
- Hardy J. 2006. Has the amyloid cascade hypothesis for Alzheimer's disease been proved? *Curr Alzheimer Res* 3(1):71-73.
- Hastings TG, Lewis DA, Zigmond MJ. 1996. Role of oxidation in the neurotoxic effects of intrastriatal dopamine injections. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93(5):1956-1961.
- Hawkes CH. 2008. The prodromal phase of sporadic Parkinson's disease: does it exist and if so how long is it? *Mov Disord* 23(13):1799-1807.
- Hawkes CH, Del Tredici K, Braak H. 2007. Parkinson's disease: a dual-hit hypothesis. *Neuropathol Appl Neurobiol* 33(6):599-614.
- Hely MA, Reid WG, Adena MA, Halliday GM, Morris JG. 2008. The Sydney multicenter study of Parkinson's disease: the inevitability of dementia at 20 years. *Mov Disord* 23(6):837-844.
- Hoehn MM, Yahr MD. 1967. Parkinsonism: onset, progression and mortality. *Neurology* 17(5):427-442.
- Hong Z, Shi M, Chung KA, Quinn JF, Peskind ER, Galasko D, Jankovic J, Zabetian CP, Leverenz JB, Baird G, Montine TJ, Hancock AM, Hwang H, Pan C, Bradner J, Kang UJ, Jensen PH, Zhang J. 2010. DJ-1 and alpha-synuclein in human cerebrospinal fluid as biomarkers of Parkinson's disease. *Brain* 133(Pt 3):713-726.
- Hornykiewicz O. 2008. Basic research on dopamine in Parkinson's disease and the discovery of the nigrostriatal dopamine pathway: the view of an eyewitness. *Neurodegener Dis* 5(3-4):114-117.
- Hughes AJ, Daniel SE, Ben-Shlomo Y, Lees AJ. 2002. The accuracy of diagnosis of parkinsonian syndromes in a specialist movement disorder service. *Brain* 125(Pt 4):861-870.
- Hughes AJ, Daniel SE, Kilford L, Lees AJ. 1992. Accuracy of clinical diagnosis of idiopathic Parkinson's disease: a clinico-pathological study of 100 cases. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 55(3):181-184.
- Hunot S, Hirsch EC. 2003. Neuroinflammatory processes in Parkinson's disease. *Ann Neurol* 53 Suppl 3:S49-58; discussion S58-60.
- Ibanez P, Bonnet AM, Debarges B, Lohmann E, Tison F, Pollak P, Agid Y, Durr A, Brice A. 2004. Causal relation between alpha-synuclein gene duplication and familial Parkinson's disease. *Lancet* 364(9440):1169-1171.
- Irizarry MC, Kim TW, McNamara M, Tanzi RE, George JM, Clayton DF, Hyman BT. 1996. Characterization of the precursor protein of the non-A beta component of senile plaques (NACP) in the human central nervous system. *J Neuropathol Exp Neurol* 55(8):889-895.
- Iwai A, Masliah E, Yoshimoto M, Ge N, Flanagan L, de Silva HA, Kittel A, Saitoh T. 1995. The precursor protein of non-A beta component of Alzheimer's disease amyloid is a presynaptic protein of the central nervous system. *Neuron* 14(2):467-475.

- Jakes R, Spillantini MG, Goedert M. 1994. Identification of two distinct synucleins from human brain. *FEBS Lett* 345(1):27-32.
- Jellinger KA. 2009. A critical evaluation of current staging of alpha-synuclein pathology in Lewy body disorders. *Biochim Biophys Acta* 1792(7):730-740.
- Ji H, Liu YE, Jia T, Wang M, Liu J, Xiao G, Joseph BK, Rosen C, Shi YE. 1997. Identification of a breast cancer-specific gene, BCSG1, by direct differential cDNA sequencing. *Cancer Res* 57(4):759-764.
- Jimenez R, Salazar G, Yin J, Joo T, Romesberg FE. 2004. Protein dynamics and the immunological evolution of molecular recognition. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101(11):3803-3808.
- Kamp F, Beyer K. 2006. Binding of alpha-synuclein affects the lipid packing in bilayers of small vesicles. *J Biol Chem* 281(14):9251-9259.
- Kayed R, Sokolov Y, Edmonds B, McIntire TM, Milton SC, Hall JE, Glabe CG. 2004. Permeabilization of lipid bilayers is a common conformation-dependent activity of soluble amyloid oligomers in protein misfolding diseases. *J Biol Chem* 279(45):46363-46366.
- Kearney JF, Vakil M. 1986. Idiotypic-directed interactions during ontogeny play a major role in the establishment of the adult B cell repertoire. *Immunol Rev* 94:39-50.
- Kemeny DM, Challacombe Sj. 1988. An Introduction to ELISA. In: Kemeny DM, Challacombe Sj, editors. *ELISA and other solid phase immunoassays; theoretical and practical aspects*. Chichester: John Wiley & Sons Ltd. p 1-23.
- Kenna JG, Major GN, Williams RS. 1985. Methods for reducing non-specific antibody binding in enzyme-linked immunosorbent assays. *J Immunol Methods* 85(2):409-419.
- Kim TD, Paik SR, Yang CH. 2002. Structural and functional implications of C-terminal regions of alpha-synuclein. *Biochemistry* 41(46):13782-13790.
- Klaver AC, Patrias LM, Coffey MP, Finke JM, Loeffler DA. 2010. Measurement of anti-Abeta1-42 antibodies in intravenous immunoglobulin with indirect ELISA: the problem of nonspecific binding. *J Neurosci Methods* 187(2):263-269.
- Kordower JH, Chu Y, Hauser RA, Freeman TB, Olanow CW. 2008. Lewy body-like pathology in long-term embryonic nigral transplants in Parkinson's disease. *Nat Med* 14(5):504-506.
- Kostka M, Hogen T, Danzer KM, Levin J, Habeck M, Wirth A, Wagner R, Glabe CG, Finger S, Heinzelmann U, Garidel P, Duan W, Ross CA, Kretschmar H, Giese A. 2008. Single particle characterization of iron-induced pore-forming alpha-synuclein oligomers. *J Biol Chem* 283(16):10992-11003.
- Kruger R, Kuhn W, Muller T, Woitalla D, Graeber M, Kosel S, Przuntek H, Epplen JT, Schols L, Riess O. 1998. Ala30Pro mutation in the gene encoding alpha-synuclein in Parkinson's disease. *Nat Genet* 18(2):106-108.
- Kuen LS, Ming CH, Fan YS. 1993. Background noise in ELISA procedures. Influence of the pH of the coating buffer and correlations with serum IgM concentration. *J Immunol Methods* 163(2):277-278.
- Lacroix-Desmazes S, Kaveri SV, Mouthon L, Ayoub A, Malanchere E, Coutinho A, Kazatchkine MD. 1998. Self-reactive antibodies (natural autoantibodies) in healthy individuals. *J Immunol Methods* 216(1-2):117-137.

- Lacroix-Desmazes S, Mouthon L, Coutinho A, Kazatchkine MD. 1995. Analysis of the natural human IgG antibody repertoire: life-long stability of reactivities towards self antigens contrasts with age-dependent diversification of reactivities against bacterial antigens. *Eur J Immunol* 25(9):2598-2604.
- Laemmli UK. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227(5259):680-685.
- Langston JW. 2006. The Parkinson's complex: parkinsonism is just the tip of the iceberg. *Ann Neurol* 59(4):591-596.
- Lashuel HA, Hartley D, Petre BM, Walz T, Lansbury PT, Jr. 2002. Neurodegenerative disease: amyloid pores from pathogenic mutations. *Nature* 418(6895):291.
- Lavedan C. 1998. The synuclein family. *Genome Res* 8(9):871-880.
- Lee HJ, Khoshaghideh F, Patel S, Lee SJ. 2004. Clearance of alpha-synuclein oligomeric intermediates via the lysosomal degradation pathway. *J Neurosci* 24(8):1888-1896.
- Lee PH, Lee G, Park HJ, Bang OY, Joo IS, Huh K. 2006. The plasma alpha-synuclein levels in patients with Parkinson's disease and multiple system atrophy. *J Neural Transm* 113(10):1435-1439.
- Lees AJ, Hardy J, Revesz T. 2009. Parkinson's disease. *Lancet* 373(9680):2055-2066.
- Lewczuk P, Kornhuber J, Wiltfang J. 2006. The German Competence Net Dementias: standard operating procedures for the neurochemical dementia diagnostics. *J Neural Transm* 113(8):1075-1080.
- Li JY, Englund E, Widner H, Rehnström S, Björklund A, Lindvall O, Brundin P. 2010. Characterization of Lewy body pathology in 12- and 16-year-old intrastriatal mesencephalic grafts surviving in a patient with Parkinson's disease. *Mov Disord* 25(8):1091-1096.
- Li Q, Gordon M, Cao C, Ugen KE, Morgan D. 2007a. Improvement of a low pH antigen-antibody dissociation procedure for ELISA measurement of circulating anti-Aβ antibodies. *BMC Neurosci* 8:22.
- Li QX, Mok SS, Laughton KM, McLean CA, Cappai R, Masters CL, Culvenor JG, Horne MK. 2007b. Plasma alpha-synuclein is decreased in subjects with Parkinson's disease. *Exp Neurol* 204(2):583-588.
- Lin MT, Beal MF. 2006. Mitochondrial dysfunction and oxidative stress in neurodegenerative diseases. *Nature* 443(7113):787-795.
- Lippi G, Guidi GC, Mattiuzzi C, Plebani M. 2006a. Preanalytical variability: the dark side of the moon in laboratory testing. *Clin Chem Lab Med* 44(4):358-365.
- Lippi G, Salvagno GL, Montagnana M, Brocco G, Guidi GC. 2006b. Influence of hemolysis on routine clinical chemistry testing. *Clin Chem Lab Med* 44(3):311-316.
- Lohle M, Storch A, Reichmann H. 2009. Beyond tremor and rigidity: non-motor features of Parkinson's disease. *J Neural Transm* 116(11):1483-1492.
- Lotharius J, Brundin P. 2002. Impaired dopamine storage resulting from alpha-synuclein mutations may contribute to the pathogenesis of Parkinson's disease. *Hum Mol Genet* 11(20):2395-2407.

- Lottspeich F, Engels JW. 2006. Bioanalytik. 2. Auflage München: Elsevier, Spektrum Akademischer Verlag.
- Luttmann W, Bratke K, Küpper M, Myrtek D. 2009. Der Experimentator: Immunologie. 3. Auflage. Heidelberg: Spektrum Akademischer Verlag.
- Lutz HU. 2007. Homeostatic roles of naturally occurring antibodies: an overview. *J Autoimmun* 29(4):287-294.
- Lutz HU, Binder CJ, Kaveri S. 2009. Naturally occurring auto-antibodies in homeostasis and disease. *Trends Immunol* 30(1):43-51.
- Ma SY, Roytta M, Rinne JO, Collan Y, Rinne UK. 1997. Correlation between neuromorphometry in the substantia nigra and clinical features in Parkinson's disease using disector counts. *J Neurol Sci* 151(1):83-87.
- Maita C, Tsuji S, Yabe I, Hamada S, Ogata A, Maita H, Iguchi-Ariga SM, Sasaki H, Ariga H. 2008. Secretion of DJ-1 into the serum of patients with Parkinson's disease. *Neurosci Lett* 431(1):86-89.
- Mandelkow E, von Bergen M, Biernat J, Mandelkow EM. 2007. Structural principles of tau and the paired helical filaments of Alzheimer's disease. *Brain Pathol* 17(1):83-90.
- Manning-Bog AB, McCormack AL, Li J, Uversky VN, Fink AL, Di Monte DA. 2002. The herbicide paraquat causes up-regulation and aggregation of alpha-synuclein in mice: paraquat and alpha-synuclein. *J Biol Chem* 277(3):1641-1644.
- Mannisto T, Surcel HM, Bloigu A, Ruokonen A, Hartikainen AL, Jarvelin MR, Pouta A, Vaarasmaki M, Suvanto-Luukkonen E. 2007. The effect of freezing, thawing, and short- and long-term storage on serum thyrotropin, thyroid hormones, and thyroid autoantibodies: implications for analyzing samples stored in serum banks. *Clin Chem* 53(11):1986-1987.
- Manoussakis MN, Tzioufas AG, Silis MP, Pange PJ, Goudevenos J, Moutsopoulos HM. 1987. High prevalence of anti-cardiolipin and other autoantibodies in a healthy elderly population. *Clin Exp Immunol* 69(3):557-565.
- Marchalonis JJ, Adelman MK, Schluter SF, Ramsland PA. 2006. The antibody repertoire in evolution: chance, selection, and continuity. *Dev Comp Immunol* 30(1-2):223-247.
- Marchalonis JJ, Kaveri S, Lacroix-Desmazes S, Kazatchkine MD. 2002. Natural recognition repertoire and the evolutionary emergence of the combinatorial immune system. *FASEB J* 16(8):842-848.
- Marchalonis JJ, Schluter SF, Bernstein RM, Hohman VS. 1998. Antibodies of sharks: revolution and evolution. *Immunol Rev* 166:103-122.
- Marder K, Levy G, Louis ED, Mejia-Santana H, Cote L, Andrews H, Harris J, Waters C, Ford B, Frucht S, Fahn S, Ottman R. 2003. Familial aggregation of early- and late-onset Parkinson's disease. *Ann Neurol* 54(4):507-513.
- Marek K, Innis R, van Dyck C, Fussell B, Early M, Eberly S, Oakes D, Seibyl J. 2001. [123I]beta-CIT SPECT imaging assessment of the rate of Parkinson's disease progression. *Neurology* 57(11):2089-2094.
- Marek K, Jennings D, Tamagnan G, Seibyl J. 2008. Biomarkers for Parkinson's [corrected] disease: tools to assess Parkinson's disease onset and progression. *Ann Neurol* 64 Suppl 2:S111-121.

- Maroteaux L, Campanelli JT, Scheller RH. 1988. Synuclein: a neuron-specific protein localized to the nucleus and presynaptic nerve terminal. *J Neurosci* 8(8):2804-2815.
- Martinez-Martin P, Gil-Nagel A, Gracia LM, Gomez JB, Martinez-Sarries J, Bermejo F. 1994. Unified Parkinson's Disease Rating Scale characteristics and structure. The Cooperative Multicentric Group. *Mov Disord* 9(1):76-83.
- Masliah E, Rockenstein E, Adame A, Alford M, Crews L, Hashimoto M, Seubert P, Lee M, Goldstein J, Chilcote T, Games D, Schenk D. 2005. Effects of alpha-synuclein immunization in a mouse model of Parkinson's disease. *Neuron* 46(6):857-868.
- Mata IF, Shi M, Agarwal P, Chung KA, Edwards KL, Factor SA, Galasko DR, Ginchina C, Griffith A, Higgins DS, Kay DM, Kim H, Leverenz JB, Quinn JF, Roberts JW, Samii A, Snapinn KW, Tsuang DW, Yearout D, Zhang J, Payami H, Zabetian CP. 2010. SNCA variant associated with Parkinson disease and plasma alpha-synuclein level. *Arch Neurol* 67(11):1350-1356.
- McKhann G, Drachman D, Folstein M, Katzman R, Price D, Stadlan EM. 1984. Clinical diagnosis of Alzheimer's disease: report of the NINCDS-ADRDA Work Group under the auspices of Department of Health and Human Services Task Force on Alzheimer's Disease. *Neurology* 34(7):939-944.
- Merbl Y, Zucker-Toledano M, Quintana FJ, Cohen IR. 2007. Newborn humans manifest autoantibodies to defined self molecules detected by antigen microarray informatics. *J Clin Invest* 117(3):712-718.
- Middleton BA, Morgan LM, Aherne GW, Marks V. 1988. The effect of storage temperature and physical state on the performance of antisera in radioimmunoassay after long-term storage. *Ann Clin Biochem* 25 (Pt 1):89-95.
- Mire-Sluis AR, Barrett YC, Devanarayan V, Koren E, Liu H, Maia M, Parish T, Scott G, Shankar G, Shores E, Swanson SJ, Taniguchi G, Wierda D, Zuckerman LA. 2004. Recommendations for the design and optimization of immunoassays used in the detection of host antibodies against biotechnology products. *J Immunol Methods* 289(1-2):1-16.
- Moalem G, Leibowitz-Amit R, Yoles E, Mor F, Cohen IR, Schwartz M. 1999. Autoimmune T cells protect neurons from secondary degeneration after central nervous system axotomy. *Nat Med* 5(1):49-55.
- Mohammad K, Esen A. 1989. A blocking agent and a blocking step are not needed in ELISA, immunostaining dot-blots and western blots. *J Immunol Methods* 117(1):141-145.
- Moir RD, Tseitin KA, Soscia S, Hyman BT, Irizarry MC, Tanzi RE. 2005. Autoantibodies to redox-modified oligomeric Abeta are attenuated in the plasma of Alzheimer's disease patients. *J Biol Chem* 280(17):17458-17463.
- Mollenhauer B, Cullen V, Kahn I, Krastins B, Outeiro TF, Pepivani I, Ng J, Schulz-Schaeffer W, Kretschmar HA, McLean PJ, Trenkwalder C, Sarracino DA, Vonsattel JP, Locascio JJ, El-Agnaf OM, Schlossmacher MG. 2008. Direct quantification of CSF alpha-synuclein by ELISA and first cross-sectional study in patients with neurodegeneration. *Exp Neurol* 213(2):315-325.
- Mollenhauer B, Trenkwalder C. 2009. Neurochemical biomarkers in the differential diagnosis of movement disorders. *Mov Disord* 24(10):1411-1426.

- Monsonogo A, Maron R, Zota V, Selkoe DJ, Weiner HL. 2001. Immune hyporesponsiveness to amyloid beta-peptide in amyloid precursor protein transgenic mice: implications for the pathogenesis and treatment of Alzheimer's disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98(18):10273-10278.
- Morgan D, Diamond DM, Gottschall PE, Ugen KE, Dickey C, Hardy J, Duff K, Jantzen P, DiCarlo G, Wilcock D, Connor K, Hatcher J, Hope C, Gordon M, Arendash GW. 2000. A beta peptide vaccination prevents memory loss in an animal model of Alzheimer's disease. *Nature* 408(6815):982-985.
- Morley JF, Hurtig HI. 2010. Current understanding and management of Parkinson disease: five new things. *Neurology* 75(18 Suppl 1):S9-15.
- Morrish PK, Sawle GV, Brooks DJ. 1996. An [¹⁸F]dopa-PET and clinical study of the rate of progression in Parkinson's disease. *Brain* 119(Pt 2):585-591.
- Mouthon L, Haury M, Lacroix-Desmazes S, Barreau C, Coutinho A, Kazatchkine MD. 1995. Analysis of the normal human IgG antibody repertoire. Evidence that IgG autoantibodies of healthy adults recognize a limited and conserved set of protein antigens in homologous tissues. *J Immunol* 154(11):5769-5778.
- Mouthon L, Lacroix-Desmazes S, Nobrega A, Barreau C, Coutinho A, Kazatchkine MD. 1996. The self-reactive antibody repertoire of normal human serum IgM is acquired in early childhood and remains conserved throughout life. *Scand J Immunol* 44(3):243-251.
- Murphy DD, Rueter SM, Trojanowski JQ, Lee VM. 2000. Synucleins are developmentally expressed, and alpha-synuclein regulates the size of the presynaptic vesicular pool in primary hippocampal neurons. *J Neurosci* 20(9):3214-3220.
- Murray IV, Giasson BI, Quinn SM, Koppaka V, Axelsen PH, Ischiropoulos H, Trojanowski JQ, Lee VM. 2003. Role of alpha-synuclein carboxy-terminus on fibril formation in vitro. *Biochemistry* 42(28):8530-8540.
- Narhi L, Wood SJ, Steavenson S, Jiang Y, Wu GM, Anafi D, Kaufman SA, Martin F, Sitney K, Denis P, Louis JC, Wypych J, Biere AL, Citron M. 1999. Both familial Parkinson's disease mutations accelerate alpha-synuclein aggregation. *J Biol Chem* 274(14):9843-9846.
- Neff F, Wei X, Nolker C, Bacher M, Du Y, Dodel R. 2008. Immunotherapy and naturally occurring autoantibodies in neurodegenerative disorders. *Autoimmun Rev* 7(6):501-507.
- Noelker C, Hampel H, Dodel R. 2011. Blood-based protein biomarkers for diagnosis and classification of neurodegenerative diseases: current progress and clinical potential. *Mol Diagn Ther* 15(2):83-102.
- Norris EH, Giasson BI, Lee VM. 2004. Alpha-synuclein: normal function and role in neurodegenerative diseases. *Curr Top Dev Biol* 60:17-54.
- Notkins AL. 2004. Polyreactivity of antibody molecules. *Trends Immunol* 25(4):174-179.
- Nuscher B, Kamp F, Mehnert T, Odoy S, Haass C, Kahle PJ, Beyer K. 2004. Alpha-synuclein has a high affinity for packing defects in a bilayer membrane: a thermodynamics study. *J Biol Chem* 279(21):21966-21975.

- O'Nuallain B, Acero L, Williams AD, Koeppen HP, Weber A, Schwarz HP, Wall JS, Weiss DT, Solomon A. 2008. Human plasma contains cross-reactive Abeta conformer-specific IgG antibodies. *Biochemistry* 47(47):12254-12256.
- O'Nuallain B, Hrnčić R, Wall JS, Weiss DT, Solomon A. 2006. Diagnostic and therapeutic potential of amyloid-reactive IgG antibodies contained in human sera. *J Immunol* 176(11):7071-7078.
- Ohrfelt A, Grognet P, Andreasen N, Wallin A, Vanmechelen E, Blennow K, Zetterberg H. 2009. Cerebrospinal fluid alpha-synuclein in neurodegenerative disorders-a marker of synapse loss? *Neurosci Lett* 450(3):332-335.
- Olanow CW, Perl DP, DeMartino GN, McNaught KS. 2004. Lewy-body formation is an aggresome-related process: a hypothesis. *Lancet Neurol* 3(8):496-503.
- Olanow CW, Prusiner SB. 2009. Is Parkinson's disease a prion disorder? *Proc Natl Acad Sci U S A* 106(31):12571-12572.
- Olanow CW, Rascol O, Hauser R, Feigin PD, Jankovic J, Lang A, Langston W, Melamed E, Poewe W, Stocchi F, Tolosa E, Investigators AS. 2009. A double-blind, delayed-start trial of rasagiline in Parkinson's disease. *N Engl J Med* 361(13):1268-1278.
- Orr CF, Rowe DB, Mizuno Y, Mori H, Halliday GM. 2005. A possible role for humoral immunity in the pathogenesis of Parkinson's disease. *Brain* 128(Pt 11):2665-2674.
- Ostrerova N, Petrucelli L, Farrer M, Mehta N, Choi P, Hardy J, Wolozin B. 1999. alpha-Synuclein shares physical and functional homology with 14-3-3 proteins. *J Neurosci* 19(14):5782-5791.
- Ouchi Y, Yoshikawa E, Sekine Y, Futatsubashi M, Kanno T, Ogusu T, Torizuka T. 2005. Microglial activation and dopamine terminal loss in early Parkinson's disease. *Ann Neurol* 57(2):168-175.
- Papachroni KK, Ninkina N, Papapanagiotou A, Hadjigeorgiou GM, Xiromerisiou G, Papadimitriou A, Kalofoutis A, Buchman VL. 2007. Autoantibodies to alpha-synuclein in inherited Parkinson's disease. *J Neurochem* 101(3):749-756.
- Parkinson J. 2002. An essay on the shaking palsy. 1817. *J Neuropsychiatry Clin Neurosci* 14(2):223-236; discussion 222.
- Patrias LM, Klaver AC, Coffey MP, Loeffler DA. 2010. Specific antibodies to soluble alpha-synuclein conformations in intravenous immunoglobulin preparations. *Clin Exp Immunol* 161(3):527-535.
- Patton A, Mullenix MC, Swanson SJ, Koren E. 2005. An acid dissociation bridging ELISA for detection of antibodies directed against therapeutic proteins in the presence of antigen. *J Immunol Methods* 304(1-2):189-195.
- Pellegrino NM, Caccavo D. 2007. Variability in anticardiolipin antibody detection: role of nonspecific IgG binding and different microtiter plates. *Clin Appl Thromb Hemost* 13(4):404-409.
- Peng X, Tehranian R, Dietrich P, Stefanis L, Perez RG. 2005. Alpha-synuclein activation of protein phosphatase 2A reduces tyrosine hydroxylase phosphorylation in dopaminergic cells. *J Cell Sci* 118(Pt 15):3523-3530.

- Perez RG, Waymire JC, Lin E, Liu JJ, Guo F, Zigmond MJ. 2002. A role for alpha-synuclein in the regulation of dopamine biosynthesis. *J Neurosci* 22(8):3090-3099.
- Perlmutter JD, Braun AR, Sachs JN. 2009. Curvature dynamics of alpha-synuclein familial Parkinson disease mutants: molecular simulations of the micelle- and bilayer-bound forms. *J Biol Chem* 284(11):7177-7189.
- Petrakis NL. 1985. Biologic banking in cohort studies, with special reference to blood. *Natl Cancer Inst Monogr* 67:193-198.
- Piechaczyk M, Bouanani M, Salhi SL, Baldet L, Bastide M, Pau B, Bastide JM. 1987. Antigenic domains on the human thyroglobulin molecule recognized by autoantibodies in patients' sera and by natural autoantibodies isolated from the sera of healthy subjects. *Clin Immunol Immunopathol* 45(1):114-121.
- Pinsky NA, Huddleston JM, Jacobson RM, Wollan PC, Poland GA. 2003. Effect of multiple freeze-thaw cycles on detection of measles, mumps, and rubella virus antibodies. *Clin Diagn Lab Immunol* 10(1):19-21.
- Poewe W. 2008. Non-motor symptoms in Parkinson's disease. *Eur J Neurol* 15 Suppl 1:14-20.
- Polymeropoulos MH, Lavedan C, Leroy E, Ide SE, Dehejia A, Dutra A, Pike B, Root H, Rubenstein J, Boyer R, Stenroos ES, Chandrasekharappa S, Athanassiadou A, Papapetropoulos T, Johnson WG, Lazzarini AM, Duvoisin RC, Di Iorio G, Golbe LI, Nussbaum RL. 1997. Mutation in the alpha-synuclein gene identified in families with Parkinson's disease. *Science* 276(5321):2045-2047.
- Porat YB, Zan-Bar I, Ravid A. 1995. Quantitative dot-blot assay for low titer anti-lipopolysaccharide antibodies in human plasma. *J Immunol Methods* 180(2):213-218.
- Purves D. 2004. Modulation of Movement by Basal Ganglia. In: *Neuroscience: Third Edition*. 3. Auflage. Sunderland: Sinauer Associates, Inc. S. 417-434.
- Racke MK, Ratts RB, Arredondo L, Perrin PJ, Lovett-Racke A. 2000. The role of costimulation in autoimmune demyelination. *J Neuroimmunol* 107(2):205-215.
- Rascol O, Ferreira JJ, Thalamas C, Galitsky M, Montastruc JL. 2001. Dopamine agonists. Their role in the management of Parkinson's disease. *Adv Neurol* 86:301-309.
- Rascol O, Goetz C, Koller W, Poewe W, Sampaio C. 2002. Treatment interventions for Parkinson's disease: an evidence based assessment. *Lancet* 359(9317):1589-1598.
- Ravindranath MH, Ravindranath RM, Morton DL, Graves MC. 1994. Factors affecting the fine specificity and sensitivity of serum antiganglioside antibodies in ELISA. *J Immunol Methods* 169(2):257-272.
- Reiber H. 2006. Liquordiagnostik. In: Berlit P (Hrsg.). *Klinische Neurologie*. 2. aktualisierte Auflage. Heidelberg: Springer Medizin Verlag. S. 137-168.
- Reichmann H. 2010. Clinical criteria for the diagnosis of Parkinson's disease. *Neurodegener Dis* 7(5):284-290.
- Relkin NR, Szabo P, Adamiak B, Burgut T, Monthe C, Lent RW, Younkin S, Younkin L, Schiff R, Weksler ME. 2009. 18-Month study of intravenous immunoglobulin for treatment of mild Alzheimer disease. *Neurobiol Aging* 30(11):1728-1736.

- Richard IH, Papka M, Rubio A, Kurlan R. 2002. Parkinson's disease and dementia with Lewy bodies: one disease or two? *Mov Disord* 17(6):1161-1165.
- Richards M, Marder K, Cote L, Mayeux R. 1994. Interrater reliability of the Unified Parkinson's Disease Rating Scale motor examination. *Mov Disord* 9(1):89-91.
- Rodrigues e Silva AM, Geldsetzer F, Holdorff B, Kielhorn FW, Balzer-Geldsetzer M, Oertel WH, Hurtig H, Dodel R. 2010. Who was the man who discovered the "Lewy bodies"? *Mov Disord* 25(12):1765-1773.
- Rowley B, Tang L, Shinton S, Hayakawa K, Hardy RR. 2007. Autoreactive B-1 B cells: constraints on natural autoantibody B cell antigen receptors. *J Autoimmun* 29(4):236-245.
- Rupin A, Gruel Y, Watier H, Girard AC, Leroy J, Bardos P. 1991. ELISA for the detection of anticardiolipin antibodies. High specificity based on the use of adult bovine serum as buffer and systematic subtraction of non-specific binding. *J Immunol Methods* 138(2):225-231.
- Sanz I, Dang H, Takei M, Talal N, Capra JD. 1989. VH sequence of a human anti-Sm autoantibody. Evidence that autoantibodies can be unmutated copies of germline genes. *J Immunol* 142(3):883-887.
- Satake W, Nakabayashi Y, Mizuta I, Hirota Y, Ito C, Kubo M, Kawaguchi T, Tsunoda T, Watanabe M, Takeda A, Tomiyama H, Nakashima K, Hasegawa K, Obata F, Yoshikawa T, Kawakami H, Sakoda S, Yamamoto M, Hattori N, Murata M, Nakamura Y, Toda T. 2009. Genome-wide association study identifies common variants at four loci as genetic risk factors for Parkinson's disease. *Nat Genet* 41(12):1303-1307.
- Schapira AH. 2008. Mitochondria in the aetiology and pathogenesis of Parkinson's disease. *Lancet Neurol* 7(1):97-109.
- Schapira AH, Cooper JM, Dexter D, Jenner P, Clark JB, Marsden CD. 1989. Mitochondrial complex I deficiency in Parkinson's disease. *Lancet* 1(8649):1269.
- Schenk D, Barbour R, Dunn W, Gordon G, Grajeda H, Guido T, Hu K, Huang J, Johnson-Wood K, Khan K, Kholodenko D, Lee M, Liao Z, Lieberburg I, Motter R, Mutter L, Soriano F, Shopp G, Vasquez N, Vandeventer C, Walker S, Wogulis M, Yednock T, Games D, Seubert P. 1999. Immunization with amyloid-beta attenuates Alzheimer-disease-like pathology in the PDAPP mouse. *Nature* 400(6740):173-177.
- Schisterman EF, Perkins NJ, Liu A, Bondell H. 2005. Optimal cut-point and its corresponding Youden Index to discriminate individuals using pooled blood samples. *Epidemiology* 16(1):73-81.
- Schlossmacher MG, Mollenhauer B. 2010. Biomarker research in Parkinson's disease: objective measures needed for patient stratification in future cause-directed trials. *Biomark Med* 4(5):647-650.
- Schrohl AS, Wurtz S, Kohn E, Banks RE, Nielsen HJ, Sweep FC, Brunner N. 2008. Banking of biological fluids for studies of disease-associated protein biomarkers. *Mol Cell Proteomics* 7(10):2061-2066.
- Schulz JB. 2008. Update on the pathogenesis of Parkinson's disease. *J Neurol* 255 Suppl 5:3-7.

- Shi M, Zabetian CP, Hancock AM, Ginchina C, Hong Z, Yearout D, Chung KA, Quinn JF, Peskind ER, Galasko D, Jankovic J, Leverenz JB, Zhang J. 2010. Significance and confounders of peripheral DJ-1 and alpha-synuclein in Parkinson's disease. *Neurosci Lett* 480(1):78-82.
- Shin EC, Cho SE, Lee DK, Hur MW, Paik SR, Park JH, Kim J. 2000. Expression patterns of alpha-synuclein in human hematopoietic cells and in *Drosophila* at different developmental stages. *Mol Cells* 10(1):65-70.
- Shoenfeld Y, Gershwin ME, Meroni PL. 2007. Autoantibodies. Amsterdam: Elsevier.
- Shoulson I, Oakes D, Fahn S, Lang A, Langston JW, LeWitt P, Olanow CW, Penney JB, Tanner C, Kieburtz K, Rudolph A, Parkinson Study G. 2002. Impact of sustained deprenyl (selegiline) in levodopa-treated Parkinson's disease: a randomized placebo-controlled extension of the deprenyl and tocopherol antioxidative therapy of parkinsonism trial. *Ann Neurol* 51(5):604-612.
- Shulman JM, De Jager PL, Feany MB. 2011. Parkinson's disease: genetics and pathogenesis. *Annu Rev Pathol* 6:193-222.
- Shults CW, Oakes D, Kieburtz K, Beal MF, Haas R, Plumb S, Juncos JL, Nutt J, Shoulson I, Carter J, Kompoliti K, Perlmutter JS, Reich S, Stern M, Watts RL, Kurlan R, Molloy E, Harrison M, Lew M, Parkinson Study G. 2002. Effects of coenzyme Q10 in early Parkinson disease: evidence of slowing of the functional decline. *Arch Neurol* 59(10):1541-1550.
- Siminovitch KA, Misener V, Kwong PC, Song QL, Chen PP. 1989. A natural autoantibody is encoded by germline heavy and lambda light chain variable region genes without somatic mutation. *J Clin Invest* 84(5):1675-1678.
- Simon-Sanchez J, Scholz S, Matarin Mdel M, Fung HC, Hernandez D, Gibbs JR, Britton A, Hardy J, Singleton A. 2008. Genomewide SNP assay reveals mutations underlying Parkinson disease. *Hum Mutat* 29(2):315-322.
- Singleton AB, Farrer M, Johnson J, Singleton A, Hague S, Kachergus J, Hulihan M, Peuralinna T, Dutra A, Nussbaum R, Lincoln S, Crawley A, Hanson M, Maraganore D, Adler C, Cookson MR, Muenter M, Baptista M, Miller D, Blacato J, Hardy J, Gwinn-Hardy K. 2003. alpha-Synuclein locus triplication causes Parkinson's disease. *Science* 302(5646):841.
- Spillantini MG, Divane A, Goedert M. 1995. Assignment of human alpha-synuclein (SNCA) and beta-synuclein (SNCB) genes to chromosomes 4q21 and 5q35. *Genomics* 27(2):379-381.
- Spillantini MG, Schmidt ML, Lee VM, Trojanowski JQ, Jakes R, Goedert M. 1997. Alpha-synuclein in Lewy bodies. *Nature* 388(6645):839-840.
- Steiner JA, Angot E, Brundin P. 2011. A deadly spread: cellular mechanisms of alpha-synuclein transfer. *Cell Death Differ* 18(9):1425-1433.
- Sveinbjornsdottir S, Hicks AA, Jonsson T, Petursson H, Gugmundsson G, Frigge ML, Kong A, Gulcher JR, Stefansson K. 2000. Familial aggregation of Parkinson's disease in Iceland. *N Engl J Med* 343(24):1765-1770.
- Swann PG, Shapiro MA. 2011. Regulatory considerations for development of bioanalytical assays for biotechnology products. *Bioanalysis* 3(6):597-603.
- Swets JA. 1988. Measuring the accuracy of diagnostic systems. *Science* 240(4857):1285-1293.

- Szabo P, Mujalli DM, Rotondi ML, Sharma R, Weber A, Schwarz HP, Weksler ME, Relkin N. 2010. Measurement of anti-beta amyloid antibodies in human blood. *J Neuroimmunol* 227(1-2):167-174.
- Tanner CM, Aston DA. 2000. Epidemiology of Parkinson's disease and akinetic syndromes. *Curr Opin Neurol* 13(4):427-430.
- Terness PI, Navolan D, Dufter C, Welschof M, Opelz G. 2002. Immunosuppressive anti-immunoglobulin autoantibodies: specificity, gene structure and function in health and disease. *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)* 48(3):271-278.
- Ternynck T, Avrameas S. 1986. Murine natural monoclonal autoantibodies: a study of their polyspecificities and their affinities. *Immunol Rev* 94:99-112.
- Thomas B, Beal MF. 2011. Molecular insights into Parkinson's disease. *F1000 Med Rep* 3:1-7.
- Thomas L. 2007. Analytik, analytische Beurteilung und klinische Bewertung von Laborbefunden. In: Thomas L (Hrsg.). *Labor und Diagnose: Indikation und Bewertung von Laborbefunden für die medizinische Diagnostik*. 7. Auflage. Frankfurt am Main: Th-Books GmbH. S. 1974-1985.
- Tinsley RB, Kotschet K, Modesto D, Ng H, Wang Y, Nagley P, Shaw G, Horne MK. 2010. Sensitive and specific detection of alpha-synuclein in human plasma. *J Neurosci Res* 88(12):2693-2700.
- Tokuda T, Qureshi MM, Ardah MT, Varghese S, Shehab SA, Kasai T, Ishigami N, Tamaoka A, Nakagawa M, El-Agnaf OM. 2010. Detection of elevated levels of alpha-synuclein oligomers in CSF from patients with Parkinson disease. *Neurology* 75(20):1766-1772.
- Tokuda T, Salem SA, Allsop D, Mizuno T, Nakagawa M, Qureshi MM, Locascio JJ, Schlossmacher MG, El-Agnaf OM. 2006. Decreased alpha-synuclein in cerebrospinal fluid of aged individuals and subjects with Parkinson's disease. *Biochem Biophys Res Commun* 349(1):162-166.
- Towbin H, Staehelin T, Gordon J. 1979. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci U S A* 76(9):4350-4354.
- Trieb K, Ransmayr G, Sgonc R, Lassmann H, Grubeck-Loebenstein B. 1996. APP peptides stimulate lymphocyte proliferation in normals, but not in patients with Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging* 17(4):541-547.
- Ueda K, Fukushima H, Masliah E, Xia Y, Iwai A, Yoshimoto M, Otero DA, Kondo J, Ihara Y, Saitoh T. 1993. Molecular cloning of cDNA encoding an unrecognized component of amyloid in Alzheimer disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90(23):11282-11286.
- Underwood JR, Pedersen JS, Chalmers PJ, Toh BH. 1985. Hybrids from normal, germ free, nude and neonatal mice produce monoclonal autoantibodies to eight different intracellular structures. *Clin Exp Immunol* 60(2):417-426.
- Uversky VN. 2007. Neuropathology, biochemistry, and biophysics of alpha-synuclein aggregation. *J Neurochem* 103(1):17-37.
- Uversky VN. 2010. Mysterious oligomerization of the amyloidogenic proteins. *FEBS J* 277(14):2940-2953.

- Uversky VN, Li J, Fink AL. 2001. Metal-triggered structural transformations, aggregation, and fibrillation of human alpha-synuclein. A possible molecular link between Parkinson's disease and heavy metal exposure. *J Biol Chem* 276(47):44284-44296.
- Van Den Eeden SK, Tanner CM, Bernstein AL, Fross RD, Leimpeter A, Bloch DA, Nelson LM. 2003. Incidence of Parkinson's disease: variation by age, gender, and race/ethnicity. *Am J Epidemiol* 157(11):1015-1022.
- Vogt RF, Jr., Phillips DL, Henderson LO, Whitfield W, Spierto FW. 1987. Quantitative differences among various proteins as blocking agents for ELISA microtiter plates. *J Immunol Methods* 101(1):43-50.
- Volles MJ, Lansbury PT, Jr. 2003. Zeroing in on the pathogenic form of alpha-synuclein and its mechanism of neurotoxicity in Parkinson's disease. *Biochemistry* 42(26):7871-7878.
- von Campenhausen S, Bornschein B, Wick R, Botzel K, Sampaio C, Poewe W, Oertel W, Siebert U, Berger K, Dodel R. 2005. Prevalence and incidence of Parkinson's disease in Europe. *Eur Neuropsychopharmacol* 15(4):473-490.
- Waragai M, Wei J, Fujita M, Nakai M, Ho GJ, Masliah E, Akatsu H, Yamada T, Hashimoto M. 2006. Increased level of DJ-1 in the cerebrospinal fluids of sporadic Parkinson's disease. *Biochem Biophys Res Commun* 345(3):967-972.
- Waxman EA, Giasson BI. 2009. Molecular mechanisms of alpha-synuclein neurodegeneration. *Biochim Biophys Acta* 1792(7):616-624.
- Weinreb PH, Zhen W, Poon AW, Conway KA, Lansbury PT, Jr. 1996. NACP, a protein implicated in Alzheimer's disease and learning, is natively unfolded. *Biochemistry* 35(43):13709-13715.
- Weiß C. 2010. Studien zu Diagnostik und Prävention. In: Weiß C, editor. *Basiswissen Medizinische Statistik*. Heidelberg: Springer Medizin Verlag. p 287-302.
- Weksler ME, Relkin N, Turkenich R, LaRusse S, Zhou L, Szabo P. 2002. Patients with Alzheimer disease have lower levels of serum anti-amyloid peptide antibodies than healthy elderly individuals. *Exp Gerontol* 37(7):943-948.
- Wilhelm KR, Yanamandra K, Gruden MA, Zamotin V, Malisauskas M, Casaite V, Darinskas A, Forsgren L, Morozova-Roche LA. 2007. Immune reactivity towards insulin, its amyloid and protein S100B in blood sera of Parkinson's disease patients. *Eur J Neurol* 14(3):327-334.
- Wilson SS, Guillian RA, Hocker EV. 1972. Studies of the stability of 18 chemical constituents of human serum. *Clin Chem* 18(12):1498-1503.
- Winner B, Jappelli R, Maji SK, Desplats PA, Boyer L, Aigner S, Hetzer C, Loher T, Vilar M, Campioni S, Tzitzilonis C, Soragni A, Jessberger S, Mira H, Consiglio A, Pham E, Masliah E, Gage FH, Riek R. 2011. In vivo demonstration that alpha-synuclein oligomers are toxic. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108(10):4194-4199.
- Wucherpfennig KW. 1994. Autoimmunity in the central nervous system: mechanisms of antigen presentation and recognition. *Clin Immunol Immunopathol* 72(3):293-306.
- Xu J, Kao SY, Lee FJ, Song W, Jin LW, Yankner BA. 2002. Dopamine-dependent neurotoxicity of alpha-synuclein: a mechanism for selective neurodegeneration in Parkinson disease. *Nat Med* 8(6):600-606.

- Yanamandra K, Gruden MA, Casaite V, Meskys R, Forsgren L, Morozova-Roche LA. 2011. alpha-synuclein reactive antibodies as diagnostic biomarkers in blood sera of Parkinson's disease patients. *PLoS One* 6(4):e18513.
- Yang YX, Wood NW, Latchman DS. 2009. Molecular basis of Parkinson's disease. *Neuroreport* 20(2):150-156.
- Youden WJ. 1950. Index for rating diagnostic tests. *Cancer* 3(1):32-35.
- Zarranz JJ, Alegre J, Gomez-Esteban JC, Lezcano E, Ros R, Ampuero I, Vidal L, Hoenicka J, Rodriguez O, Atares B, Llorens V, Gomez Tortosa E, del Ser T, Munoz DG, de Yebenes JG. 2004. The new mutation, E46K, of alpha-synuclein causes Parkinson and Lewy body dementia. *Ann Neurol* 55(2):164-173.
- Zecca L, Wilms H, Geick S, Claassen JH, Brandenburg LO, Holzknecht C, Panizza ML, Zucca FA, Deuschl G, Sievers J, Lucius R. 2008. Human neuromelanin induces neuroinflammation and neurodegeneration in the rat substantia nigra: implications for Parkinson's disease. *Acta Neuropathol* 116(1):47-55.
- Zhang J, Sokal I, Peskind ER, Quinn JF, Jankovic J, Kenney C, Chung KA, Millard SP, Nutt JG, Montine TJ. 2008. CSF multianalyte profile distinguishes Alzheimer and Parkinson diseases. *Am J Clin Pathol* 129(4):526-529.
- Zucca FA, Giaveri G, Gallorini M, Albertini A, Toscani M, Pezzoli G, Lucius R, Wilms H, Sulzer D, Ito S, Wakamatsu K, Zecca L. 2004. The neuromelanin of human substantia nigra: physiological and pathogenic aspects. *Pigment Cell Res* 17(6):610-617.

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

°C	Grad Celsius
Abb.	Abbildung
AD	Alzheimer Demenz
AFP	Alpha-Fetoprotein
APP	<i>amyloid precursor protein</i>
AUC	<i>Area Under the Curve</i>
A β	β -Amyloid
BSA	Rinderserumalbumin (<i>bovine serum albumine</i>)
bzw.	beziehungsweise
CEA	Carcinoembryonales Antigen
DDT	Dichlordiphenyltrichlorethan
DNA	Desoxyribonukleinsäure (<i>desoxyribonucleic acid</i>)
ELISA	<i>Enzyme-linked ImmunoSorbent Assay</i>
engl.	englisch
et al.	et alii
FCS	fetales Kälberserum (<i>fetal calf serum</i>)
g	Gramm
g	Gravitationsbeschleunigung
h	Stunde
H ₂ O	Wasser
HCl	Salzsäure
HRP	Meerrettichperoxidase (<i>horseradish peroxidase</i>)
Ig	Immunglobulin
IPS	Idiopathisches Parkinsonsyndrom
k.A	keine Angabe
kDa	Kilodalton
kg	Kilogramm
l	Liter
lat.	lateinisch
LDS	Lithiumdodecylsulfat (<i>lithium dodecyl sulfat</i>)
M	molar
MaMiPu	Magermilchpulver
mg	Milligramm
min	Minute

ml	Milliliter
mM	millimolar
MMSE	Mini Mental Status Examination
NaCl	Natriumchlorid
NaCNBH₃	Zyanoborohydrid
NaOH	Natriumhydroxid
ng	Nanogramm
NGS	normales Ziegenserum (<i>normal goat serum</i>)
NINCDS - ADRDA	<i>National Insitute of Neurological and Communicative Disorders and Stroke und Alzheimer Disease and Related Disorders Association</i>
nm	Nanometer
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PARS	<i>Parkinson Associated at Risk Study</i>
PBS	Phosphatpuffer (<i>phosphate buffered saline</i>)
pH	potentia Hydrogenii
p.a.	per anno
PVDF	Polyvinylidendifluorid
REM	<i>Rapid Eye Movement</i>
ROC	<i>Receiver Operating Characteristics</i>
RT	Raumtemperatur
SDS	Natriumdodecylsulfat (<i>sodium dodecyl sulfat</i>)
SNP	<i>Single Nucleotide Polymorphism</i>
SNpc	<i>Substantia nigra pars compacta</i>
TMB	Tetramethylbenzidin
TRIS	tris(hydroxymethyl)-aminomethan
UPDRS	<i>Unified Parkinson Disease Rating Scale</i>
VK	Variationskoeffizient
vs.	versus
z.B.	zum Beispiel
ZNS	zentrales Nervensystem
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
µM	mikromolar

ABBILDUNGS- UND TABELLENVERZEICHNIS

Abbildungen:

Abb. 1: Schematische Darstellung der motorischen Komponenten (...)	11
Abb. 2: Stadien der Lewy-Körperchen-Pathologie nach Braak et al. (2003)	13
Abb. 3: Affinitätschromatographie	49
Abb. 4: Aufbau eines indirekten ELISAs	55
Abb. 5: Aufbau eines Sandwich ELISAs	56
Abb. 6: Western-Blot zur Prüfung der Bindungsspezifität (...)	64
Abb. 7: Ausgangsprotokoll des indirekten ELISAs	66
Abb. 8: Absorptionssignal gemessen in α -Synuclein beschichteten Wells (...)	69
Abb. 9: Auflistung der getesteten Blockierungs- und Verdünnungslösungen	70
Abb. 10: Vergleich unterschiedlicher BSA Konzentrationen (...)	71
Abb. 11: Vergleich unterschiedlicher Tween20 Konzentrationen mit BSA (...)	72
Abb. 12: Vergleich unterschiedlicher ELISA Platten	73
Abb. 13: Vergleich unterschiedlicher Konzentrationen der α -Synucleinbeschichtung	74
Abb. 14: Vergleich verschiedener Verdünnungen des Sekundärantikörpers	75
Abb. 15: Parallele Messung des Absorptionssignals (...)	76
Abb. 16: Bindungsspezifität des affinitätsgereinigten IVIg Autoantikörpers (...)	78
Abb. 17: Repräsentative Standardkurve des α -Synuclein Autoantikörper ELISAs	80
Abb. 18: <i>Spike-Recovery</i> α -Synuclein Autoantikörper Serum ELISA	82
Abb. 19: Linearitätsnachweis zweier individueller Serumproben	83
Abb. 20: Schachbrettmessung zur Optimierung des <i>signal:noise</i> Quotienten	87

Abb. 21: Repräsentative Standardkurve des α -Synuclein ELISAs	88
Abb. 22: <i>Spike-Recovery</i> α -Synuclein Serum ELISA	89
Abb. 23: Linearitätsnachweis zweier individueller Serumproben	90
Abb. 24: Auflistung der getesteten Blockierungs- und Verdünnungslösungen.....	93
Abb. 25: Quantitative ELISA Messung der Konzentration des natürlich vorkommenden Autoantikörpers gegen α -Synuclein (...)	96
Abb. 26: Diagramm Alter und Konzentration (...).....	97
Abb. 27: A: Hoehn und Yahr Stadium (...). B: UPDRS (...). C: Krankheitsdauer (...) ...	98
Abb. 28: ROC Kurven α -Synuclein Autoantikörper Serum ELISA.....	99
Abb. 29: Two-Graph-ROC Analyse. A: IPS-Patienten vs. gesunde Kontrollen. B: IPS- vs. AD-Patienten	100
Abb. 30: Quantitative ELISA Messung der Konzentration des α -Synucleins (...).....	102
Abb. 31: Diagramm Konzentration des freien α -Synuclein im Serum und des natürlich vorkommenden Autoantikörpers gegen α -Synuclein im Serum.....	103

Tabellen:

Tab. 1: UK Brain Bank Kriterien nach Gibb und Lees (1988).....	15
Tab. 2: Nachweis der Verdünnungslinearität des Autoantikörper ELISAs (...).....	83
Tab. 3: Intra- und Inter-Assay Variationskoeffizient (VK) für den α -Synuclein Autoantikörper Serum ELISA	85
Tab. 4: Nachweis der Verdünnungslinearität für den α -Synuclein ELISA (...).....	90
Tab. 5: Intra- und Inter-Assay Variationskoeffizient (VK) für den α -Synuclein Serum ELISA	91
Tab. 6: Klinische und demographische Daten der rekrutierten Probanden.....	94
Tab. 7: Sensitivität und Spezifität des Autoantikörper ELISAs (...).....	100

KLINISCHE BEURTEILUNGSSKALEN

Hoehn und Yahr Stadien (Hoehn and Yahr 1967):

- Stadium 0** Keine Anzeichen der Erkrankung.
- Stadium 1** Einseitige Erkrankung.
- Stadium 2** Beidseitige Erkrankung ohne Gleichgewichtsstörung.
- Stadium 3** Leichte bis mäßige beidseitige Erkrankung; leichte Haltungsinstabilität; körperlich unabhängig.
- Stadium 4** Starke Behinderung; kann noch ohne Hilfe gehen und stehen.
- Stadium 5** Ohne Hilfe auf den Rollstuhl angewiesen oder bettlägerig.

Teil III (motorischer Anteil) der UPDRS (Fahn et al. 1987; Martinez-Martin et al. 1994):

Items werden mit einem Zahlenwert zwischen 0 und 4 bewertet und anschließend addiert.

Sprache

0. Normal.
1. Leichte Abnahme von Ausdruck, Diktion und/oder Volumen.
2. Monoton, verwaschen, aber verständlich; mäßig behindert.
3. Deutliche Beeinträchtigung, schwer zu verstehen.
4. Unverständlich.

Gesichtsausdruck

0. Normal.
1. Minimal veränderte Mimik, könnte ein normales "Pokergesicht" sein.
2. Leichte, aber eindeutig abnorme Verminderung des Gesichtsausdruckes.
3. Mäßig verminderte Mimik; Lippen zeitweise geöffnet.
4. Maskenhaftes oder erstarrtes Gesicht mit stark oder völlig fehlendem Ausdruck; der Mund steht mindestens 0,5cm offen.

Ruhetremor – Gesicht, rechte und linke Hand, rechter und linker Fuß.

0. Keine.
1. Leicht und selten vorhanden.
2. Geringe Amplitude persistierend; oder mäßige Amplitude, aber nur intermittierend auftretend.
3. Mäßige Amplitude, die meiste Zeit vorhanden.
4. Große Amplitude, die meiste Zeit vorhanden.

Aktions- oder Haltungstremor der Hände – je rechts und links.

0. Fehlt.
1. Leicht; bei Bewegung vorhanden.
2. Mäßige Amplitude, bei Bewegung vorhanden.
3. Mäßige Amplitude, bei Beibehalten der Haltung und bei Bewegung vorhanden.
4. Große Amplitude; beim Essen störend.

Rigidität (Geprüft bei passiver Bewegung der großen Gelenke am sitzenden Patienten. Zahnradphänomen kann ignoriert werden) – Nacken und je rechte und linke obere Extremität, je rechte und linke untere Extremität.

0. Fehlt.
1. Leicht oder nur erkennbar bei Aktivierung durch spiegelbildliche oder andere Bewegungen.
2. Leicht bis mäßig.
3. Ausgeprägt, jedoch voller Bewegungsumfang bleibt erreicht.
4. Stark; Schwierigkeit beim Ausführen aller Bewegungen.

Fingerklopfen (Patient berührt in rascher Reihenfolge und bei größtmöglicher Amplitude und mit jeder Hand gesondert den Daumen mit dem Zeigefinger) – je rechts und links.

0. Normal.
1. Leichte Verlangsamung und/oder Verringerung der Amplitude.
2. Mäßig eingeschränkt. Eindeutige und frühzeitige Ermüdung. Bewegung kann gelegentlich unterbrochen werden.
3. Stark eingeschränkt. Verzögerter Start der Bewegungen oder Unterbrechung fortlaufender Bewegungen.
4. Kann die Aufgabe kaum ausführen.

Handbewegungen (Patient öffnet und schließt die Hände in rascher Reihenfolge bei größtmöglicher Amplitude und mit jeder Hand gesondert) – je rechts und links.

0. Normal.
1. Leichte Verlangsamung und/oder Verringerung der Amplitude.
2. Mäßig eingeschränkt. Eindeutige und frühzeitige Ermüdung. Bewegung kann gelegentlich unterbrochen werden.
3. Stark eingeschränkt. Verzögerter Start der Bewegungen oder Unterbrechung fortlaufender Bewegungen.
4. Kann die Aufgabe kaum ausführen.

Rasch wechselnde Bewegungen der Hände (Pronation-Supinationsbewegungen der Hände, vertikal oder horizontal, mit größtmöglicher Amplitude, beide Hände gleichzeitig) – je rechts und links.

0. Normal.
1. Leichte Verlangsamung und/oder Verringerung der Amplitude.
2. Mäßig eingeschränkt. Eindeutige und frühzeitige Ermüdung. Bewegung kann gelegentlich unterbrochen werden.

3. Stark eingeschränkt. Verzögerter Start der Bewegungen oder Unterbrechung fortlaufender Bewegungen.
4. Kann die Aufgabe kaum ausführen.

Beweglichkeit der Beine (Der Patient klopft in rascher Reihenfolge mit der Ferse auf den Boden und hebt dabei das ganze Bein an. Die Amplitude sollte mindestens 10cm betragen) – je rechts und links.

0. Normal.
1. Leichte Verlangsamung und/oder Verringerung der Amplitude.
2. Mäßig eingeschränkt. Eindeutige und frühzeitige Ermüdung. Bewegung kann gelegentlich unterbrochen werden.
3. Stark eingeschränkt. Verzögerter Start der Bewegungen oder Unterbrechung fortlaufender Bewegungen.
4. Kann die Aufgabe kaum ausführen.

Vom Stuhl aufstehen (Patient versucht mit vor der Brust verschränkten Armen von einem Holz- oder Metallstuhl mit gerader Lehne aufzustehen).

0. Normal.
1. Langsam; kann mehr als einen Versuch benötigen.
2. Stößt sich an den Armlehnen hoch.
3. Neigt zum Zurückfallen und muss es eventuell mehrmals versuchen, kann jedoch ohne Hilfe aufstehen.
4. Kann ohne Hilfe nicht aufstehen.

Haltung

0. Normal aufrecht.
1. Nicht ganz aufrecht, leicht vorgebeugte Haltung; könnte bei einem älteren Menschen normal sein.
2. Mäßig vorgebeugte Haltung; eindeutig abnorm, kann leicht zu einer Seite geneigt sein.
3. Stark vorgebeugte Haltung mit Kyphose; kann mäßig zu einer Seite geneigt sein.
4. Ausgeprägte Beugung mit extrem abnormer Haltung.

Gang

0. Normal.
1. Geht langsam, kann einige kurze Schritte schlurfen, jedoch keine Festination oder Propulsion.
2. Gehen schwierig, benötigt aber wenig oder keine Hilfe; eventuell leichtes Trippeln, kurze Schritte oder Propulsion.
3. Starke Gehstörung, benötigt Hilfe.
4. Kann überhaupt nicht gehen, auch nicht mit Hilfe.

Haltungsstabilität (Reaktion auf plötzliches Verlagern nach hinten durch Ziehen an den Schultern des Patienten; der mit geöffneten Augen und leicht auseinander stehenden Füßen geradesteht. Der Patient ist darauf vorbereitet).

0. Normal.

1. Retropulsion, gleicht aber ohne Hilfe aus.
2. Fehlen einer Haltungsreaktion; würde fallen, wenn er nicht vom Untersucher aufgefangen würde.
3. Sehr instabil; neigt dazu, spontan das Gleichgewicht zu verlieren.
4. Kann nicht ohne Unterstützung stehen.

Bradykinesie und Hypokinesie des Körpers (Kombination aus Langsamkeit, Zögern, verminderten Mitbewegungen der Arme, geringe Bewegungsamplitude und allgemeine Bewegungsarmut).

0. Keine.
1. Minimale Verlangsamung, Bewegung wirkt beabsichtigt; könnte bei manchen Menschen normal sein. Möglicherweise herabgesetzte Amplitude.
2. Leichte Verlangsamung und Bewegungsarmut, die eindeutig abnorm sind. Alternativ auch herabgesetzte Amplitude.
3. Mäßige Verlangsamung und Bewegungsarmut oder Herabsetzung der Amplitude.
4. Ausgeprägte Verlangsamung, Bewegungsarmut oder Herabsetzung der Amplitude.

DANKSAGUNG

Die vorliegende Arbeit wurde in der Klinik für Neurologie am Universitätsklinikum Gießen und Marburg, Standort Marburg, in der Arbeitsgruppe Neurologische Therapieforschung unter Leitung von Herrn Prof. Dr. med. R. Dodel angefertigt.

Ich danke Herrn Prof. Dr. med. R. Dodel herzlich für seine ausgezeichnete Betreuung und kontinuierliche Motivation. Allen Mitgliedern der Arbeitsgruppe möchte ich für ihre Unterstützung und das angenehme kollegiale Arbeitsklima danken.

Mein besonderer Dank gilt Frau Dr. sc. hum. Daniela Besong-Agbo, die diese Arbeit mit ihrem unermüdlichen Engagement und ihrer konstruktiven wissenschaftlichen Betreuung überhaupt erst möglich gemacht hat. Zu dem sind Frau Christine Forbach und Herr Andreas Kautz zu nennen, auf deren hilfreiche Unterstützung ich mich bei der praktischen Laborarbeit immer verlassen konnte.

Herrn Dr. med. Matthias Oechsner (Parkinson-Klinik, Bad Nauheim) danke ich für die Möglichkeit in seiner Klinik Patienten rekrutieren zu dürfen. Für die großzügige Bereitstellung eines Großteils der verwendeten Patientenproben möchte ich Herrn Prof. Dr. med. Frank Jessen (Klinik und Poliklinik für Psychiatrie und Psychotherapie, Universität Bonn) und Herrn Prof. Dr. med. Werner Poewe (Universitätsklinik für Neurologie, medizinische Universität Innsbruck) danken.

Mein besonderer Dank gilt allen Studienteilnehmern, die sich zur Teilnahme an der Studie bereit erklärt haben. Ohne sie wäre diese Arbeit nicht möglich gewesen.

Zuletzt möchte ich meiner Familie danken, die mich stets in jeder erdenklichen Weise in allen Phasen dieser Arbeit unterstützt und motiviert hat.

LISTE DER AKADEMISCHEN LEHRER

Meine akademischen LehrerInnen an der Philipps-Universität Marburg waren die Damen und Herren:

Adamkiewicz, Alter, Arabin, Aumüller, Barth, Bartsch, Basler, Bauer, Baum, Becker K., Becker S., Benes, Czubayko, Daut, Dodel, Donner-Banzhoff, Eggert, Eilers, Fendrich, Feuser, Fuchs-Winkelmann, Görg, Gress, Grzeschik, Hamer, Hassan, Hellmeyer, Hertl, Heverhagen, Höffken, Hofmann, Höglinger, Hoyer, Jansen, Kaltenborn, Kann, Kircher, Klose, Knake, König, Koolman, Kühnert, Leonhardt, Lill, Löffler, Lohoff, Maier, Maisch, Mandrek, Mennel, Michl, Moll, Moosdorf, Mueller, Mutters, Neubauer, Neumüller, Nimsky, Oertel, Pagenstecher, Plant, Printz, Renz, Richter, Riße, Röhm, Röper, Rothmund, Ruchholtz, Schäfer H., Schäfer J., Schmidt, Schneider, Schofer, Schrader, Sekundo, Tackenberg, Vogelmeier, Wagner, Waldegger, Weihe, Werner, Westermann und Wulf.